



# Importantes fatores de estresse na criação intensiva de animais

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



---

---

---

---

---

---

---

---

## Abordagem do conteúdo



- 1) Práticas de manejo
  - 1.1) Desmame de suínos
- 2) Interação positivas e negativas na gestação
  - 2.1) Ovelhas
  - 2.2) Cabras
- 3) 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.

Broom, 1996; Duncan 1993; Fraser & Duncan, 1993



---

---

---

---

---

---

---

---

## Desafios



- 1) Falta de validação científica dos indicadores de bem-estar animal.
- 2) Necessidade de melhorar a comunicação entre os vários atores.



---

---

---

---

---

---

---

---

## Resumo das grandes áreas!



- 1) Alojamento inadequado
- 2) Intervenções cirúrgicas sem controle de dor
- 3) Transporte
- 4) Abate
- 5) Manejo inadequado



---

---

---

---

---

---

---

---

## Resumo das grandes áreas!



- 6) Critérios de seleção genética
- 7) Mão-de-obra não qualificada
- 8) Fome
- 9) Doenças
- 10) Extremos de temperatura
- 11) Ambiente social inadequado
- 12) Separação materna prematura



---

---

---

---

---

---

---

---

## Qual é o desafio?



- Desenvolvimento de protocolos científicos para avaliar e assegurar o bem-estar dos animais.
- Este desafio foi endereçado pelos projetos:
  - 1) Welfare Quality®
  - 2) Animal Welfare Indicators ([www.animal-welfare-indicators.net](http://www.animal-welfare-indicators.net)).



---

---

---

---

---

---

---

---

## 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”



---

---

---

---

---

---

---

---

## Trajétória 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.



---

---

---

---

---

---

---

---

## Trajétória do cérebro e bem-estar animal



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



---

---

---

---

---

---

---

---

## Interação homem e animais



❖ **Manejo negativo**  
Bem estar comprometido  
(Hemsworth & Coleman, 1998)



❖ **Manejo positivo**  
Melhoria no bem-estar  
(Waiblinger et al., 2006)



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



---

---

---

---

---

---

---

---

## Medidas relevantes ao cérebro



- Eu vou utilizar o nosso trabalho sobre desmame de suínos e manejo, manejo de suínos, manejo de ovelhas e cabras 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



---

---

---

---

---

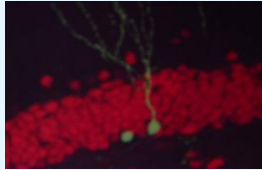
---

---

## Expectativas



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



---

---

---

---

---

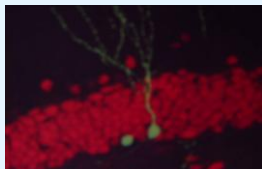
---

---

## 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)



---

---

---

---

---

---

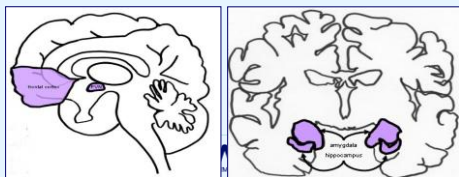
---

---

## 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 $\beta$ HSD1 e 11 $\beta$ 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)



---

---

---

---

---

---

---

## Michigan State University



Adriana Souza

Kirsty Laughlin

Heather Hodges



---

---

---

---

---

---

---

### 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 m<sup>2</sup>/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 m<sup>2</sup>/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



---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

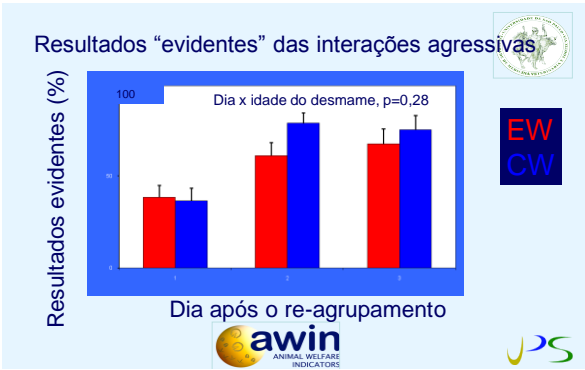
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---

**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

---

---

---

---

---

---

---

---

**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

---

---

---

---

---

---

---

---



## 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



---

---

---

---

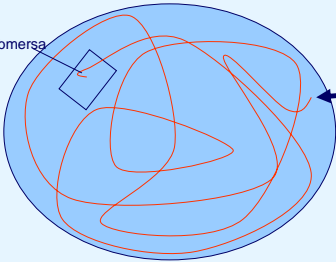
---

---

---

---

Plataforma submersa



Largada



---

---

---

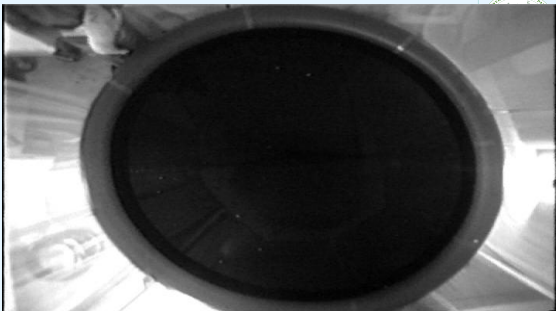
---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---



- 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)




---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---




---

---

---

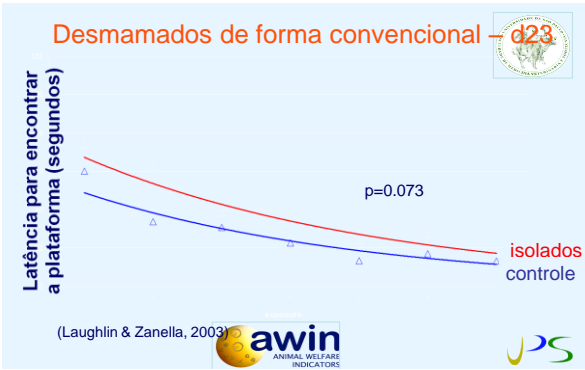
---

---

---

---

---




---

---

---

---

---

---

---

---



**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 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase-1 (**11 $\beta$ -HSD1**)

11 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase-2 (**11 $\beta$ -HSD2**)

Regula a ação dos glicocorticóides  
Metabolismo: cortisona=inativo  
11 $\beta$ -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 $\beta$ -HSD 1      - 11 $\beta$ -HSD 2

- MR                      -GR

- Quantificação relativa (Livak, 1997)

- T-test



---

---

---

---

---

---

---

---

## Resultados: hipocampo



❖ Genes x idade ( $p = 0.006$ )

- Leitões de 12-dias  $\downarrow$  11  $\beta$  HSD2<sup>†</sup>,  $\downarrow$ GR<sup>\*\*\*</sup>,  
 $\downarrow$ MR<sup>†</sup> 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.



---

---

---

---

---

---

---

---



## Estresse pré-natal em ovelhas

Coulon et al. (2013)

53

---

---

---

---

---

---

---

---

## Oslo



Marjorie Coulon

Sophie Hild



---

---

---

---

---

---

---

---

## 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., Schroerer A., Andersen I.L. and Zanella A.J. (2011);  
Hild S\*, Coulon M\*, Schroerer A., Janczak AM and Zanella AJ (2011).



---

---

---

---

---

---

---

---

## Scotland on Sunday, 09/06/2013



Reportagem sobre o trabalho de pesquisa que desenvolvemos (Coulon, et al., 2013)



---

---

---

---

---

---

---

---

## 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 ultimas 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



---

---

---

---

---

---

---

---

## Resultados



- Concentração mais elevada de cortisona na placenta de ovelhas tratadas positivamente
  - Atividade enzimática (HSD) reduzida em ovelhas tratadas negativamente ?



---

---

---

---

---

---

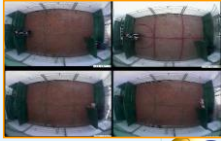
---

---

## 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



---

---

---

---

---

---

---

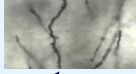
---

### 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




---

---

---

---

---

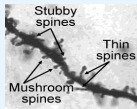
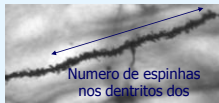
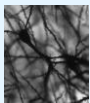
---

---

---

### 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)



neuronios apicais




---

---

---

---

---

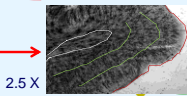
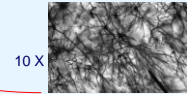
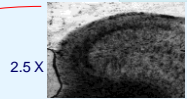
---

---

---

### 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)




---

---

---

---

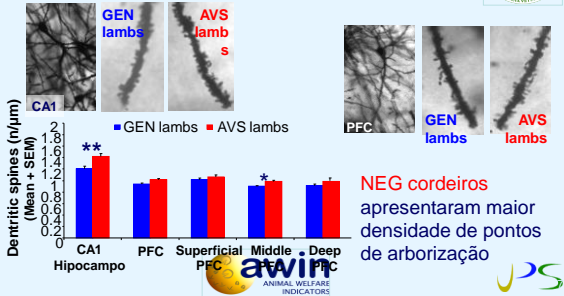
---

---

---

---

## Coulon et al.(2013)




---

---

---

---

---

---

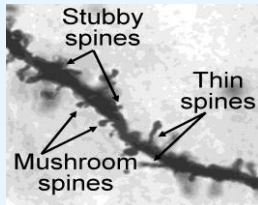
---

---

## 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%,  $p=0.047$ ).




---

---

---

---

---

---

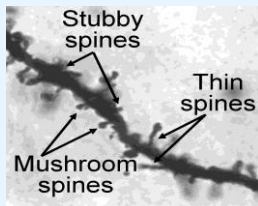
---

---

## 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 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**



---

---

---

---

---

---

---

---



## Estresse pré-natal em cabras

Baxter et al. (em avaliação)

---

---

---

---

---

---

---

---



---

---

---

---

---

---

---

---

## Baxter et al., 2016

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



---

---

---

---

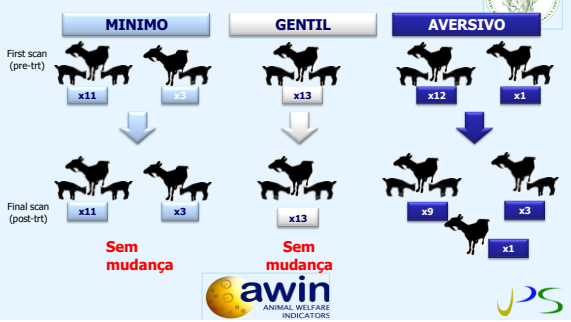
---

---

---

---

## Resultados – Fetos




---

---

---

---

---

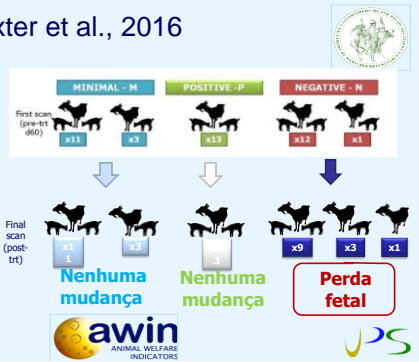
---

---

---

## Baxter et al., 2016

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




---

---

---

---

---

---

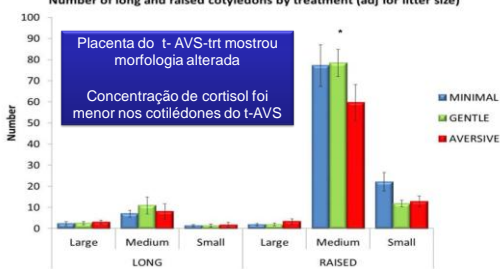
---

---

## Resultados-placenta



Number of long and raised cotyledons by treatment (adj for litter size)




---

---

---

---

---

---

---

---

## 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




---

---

---

---

---

---

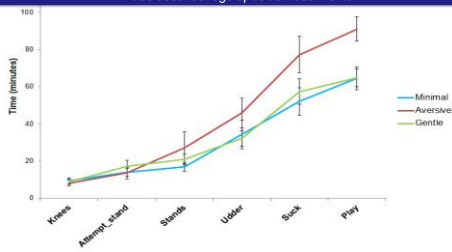
---

---

## Resultados: comportamento



Cabritos nascidos de fêmeas tratadas aversivamente responderam mais vagarosamente 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




---

---

---

---

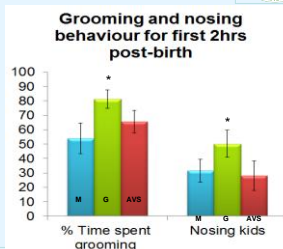
---

---

---

---

## Comportamento materno




---

---

---

---

---

---

---

---

## Desmame de suínos. Manejo prenatal em ovinos e caprinos



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




---

---

---

---

---

---

---

---

## 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
- .A relação com os humanos é de extrema importância para o bem-estar animal.



---

---

---

---

---

---

---

---

## 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](http://www.animal-welfare-indicators.net)).



---

---

---

---

---

---

---

---

## Agradecimento



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



---

---

---

---

---

---

---

---

Obrigado!

[adroaldo.zanella@usp.br](mailto:adroaldo.zanella@usp.br)



animal welfare  
science hub

<http://www.animalwelfarehub.com>



---

---

---

---

---

---

---

---