



# 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”



# 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.

# Trajетória 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 periodo 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

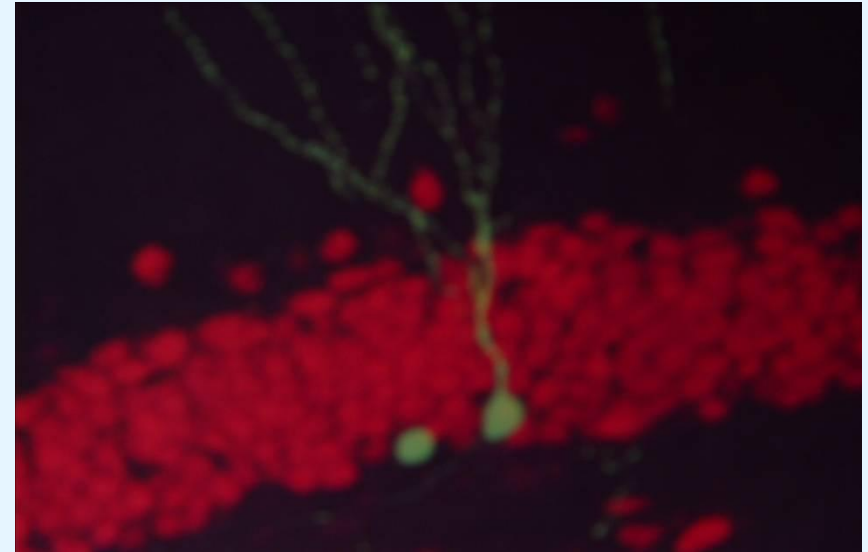
Sophie Hild



# Expectativas

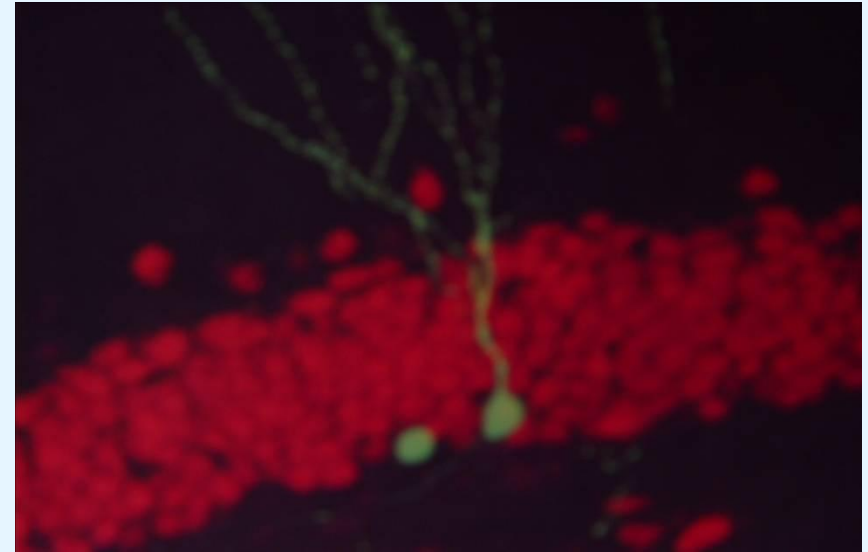


- Ambiente adverso
  - Estresse**
    - Perda de neurônios
    - Atrofia de dendritos
    - Comprometimento cognitivo
    - Problemas emocionais



# 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



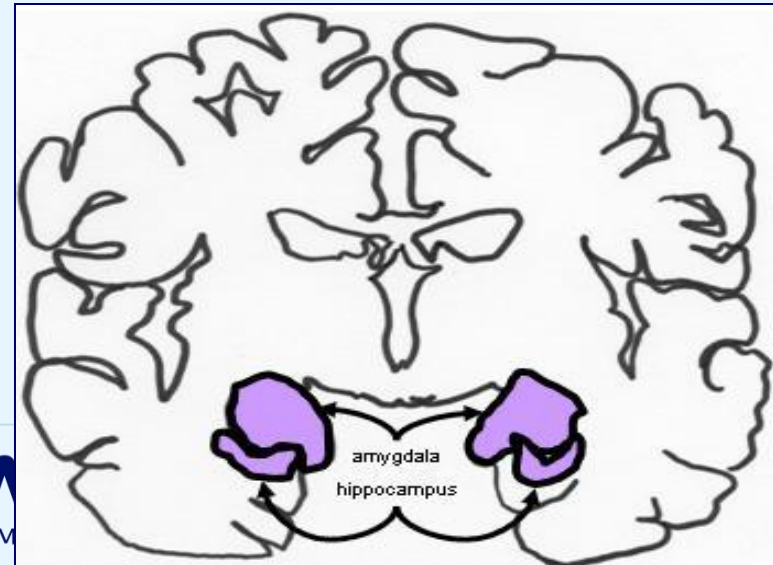
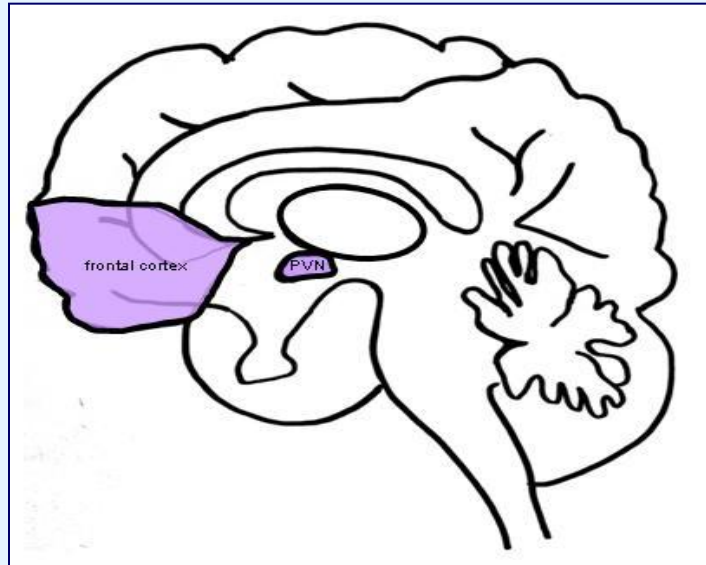
- Mineralocorticoides (MR)
  - Mineralocorticoides (MC)
    - Aldosterona
  - Glicocorticóides (GC)





# 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

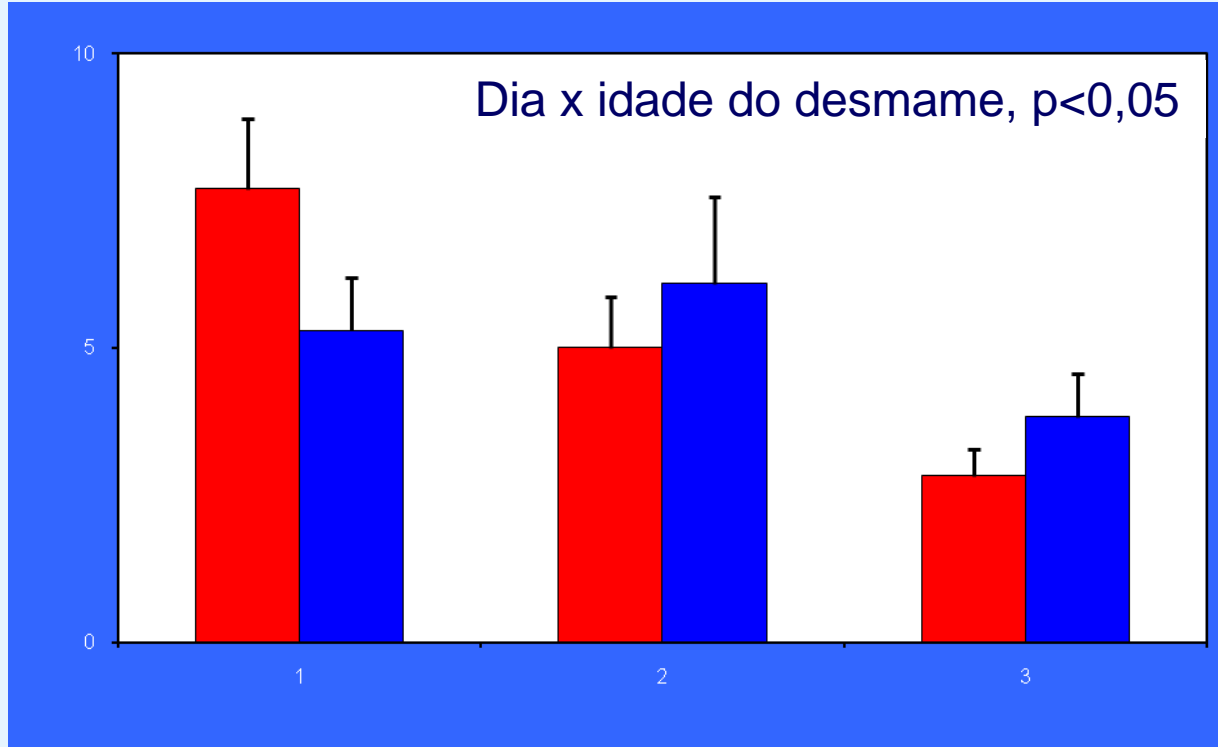
- General linear mixed model (SAS 8.2)
- Somente pares EW-EW e pares CW-CW



# Número de interações agressivas



Encontros agressivos



EW  
CW

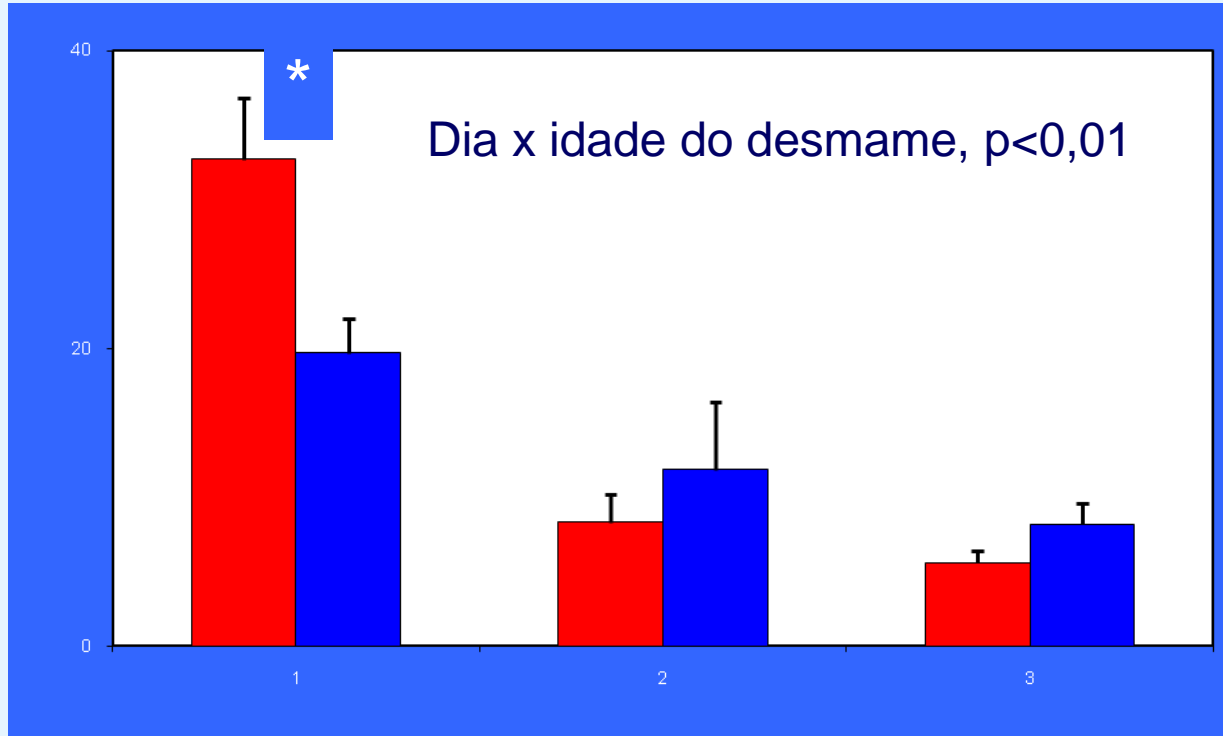
Dias após ao re-agrupamento



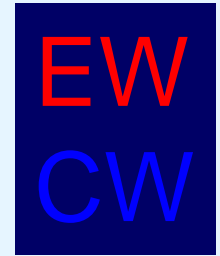
# Duração média dos encontros agressivos



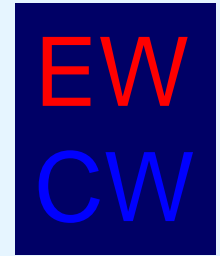
Duração média (segundos)



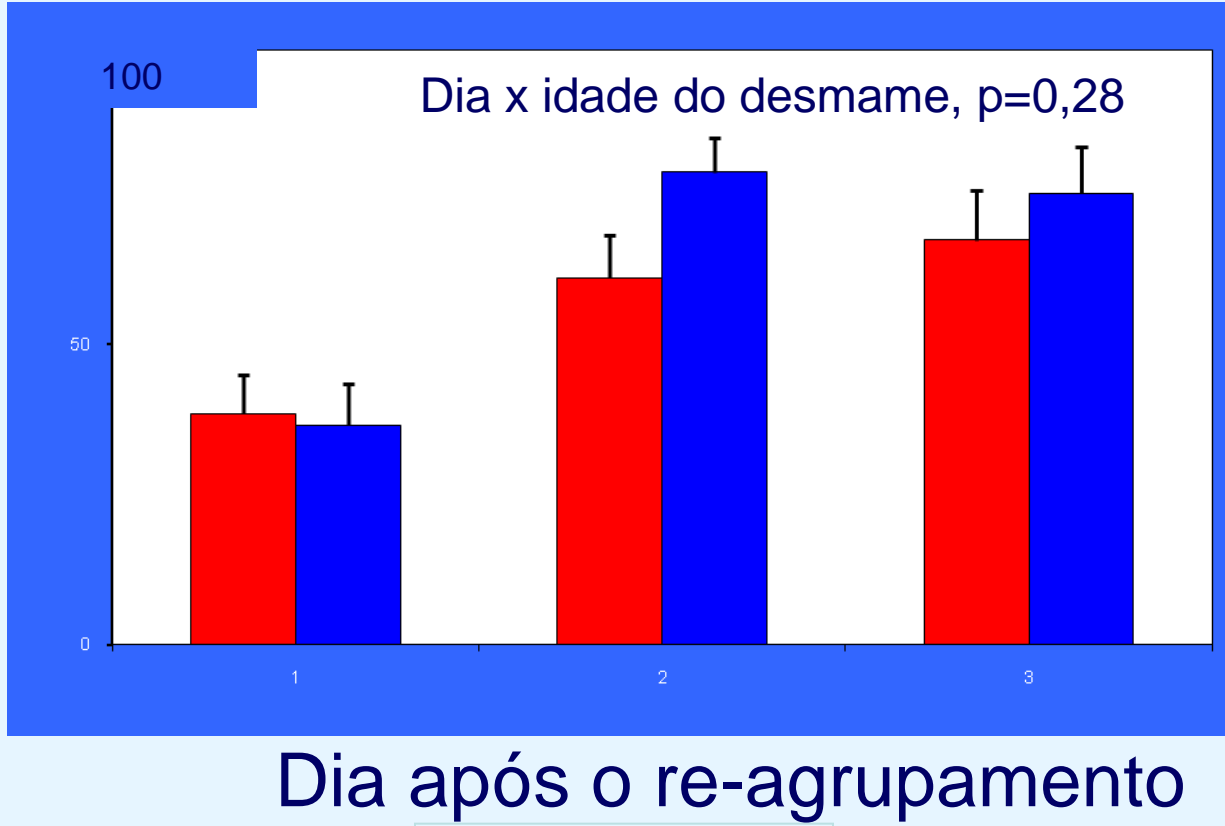
Dias após o re-agrupamento



# Resultados “evidentes” das interações agressivas



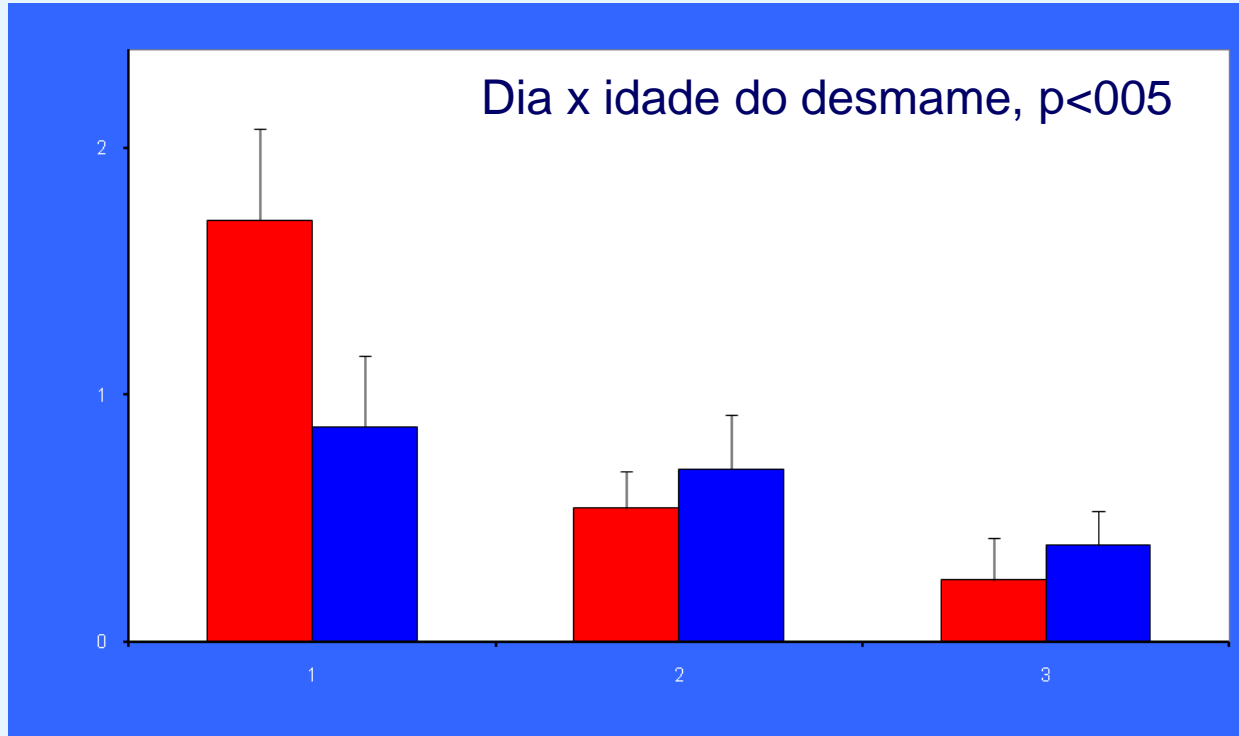
Resultados evidentes (%)



# Iniciador” não venceu



# de interações agressivas



EW

CW

D<sub>1</sub>:45%  
D<sub>1</sub>:35%

D<sub>2</sub>:25%  
D<sub>2</sub>:20%

D<sub>3</sub>:15%  
D<sub>3</sub>:20%

Dia após o re-agrupamento



# 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

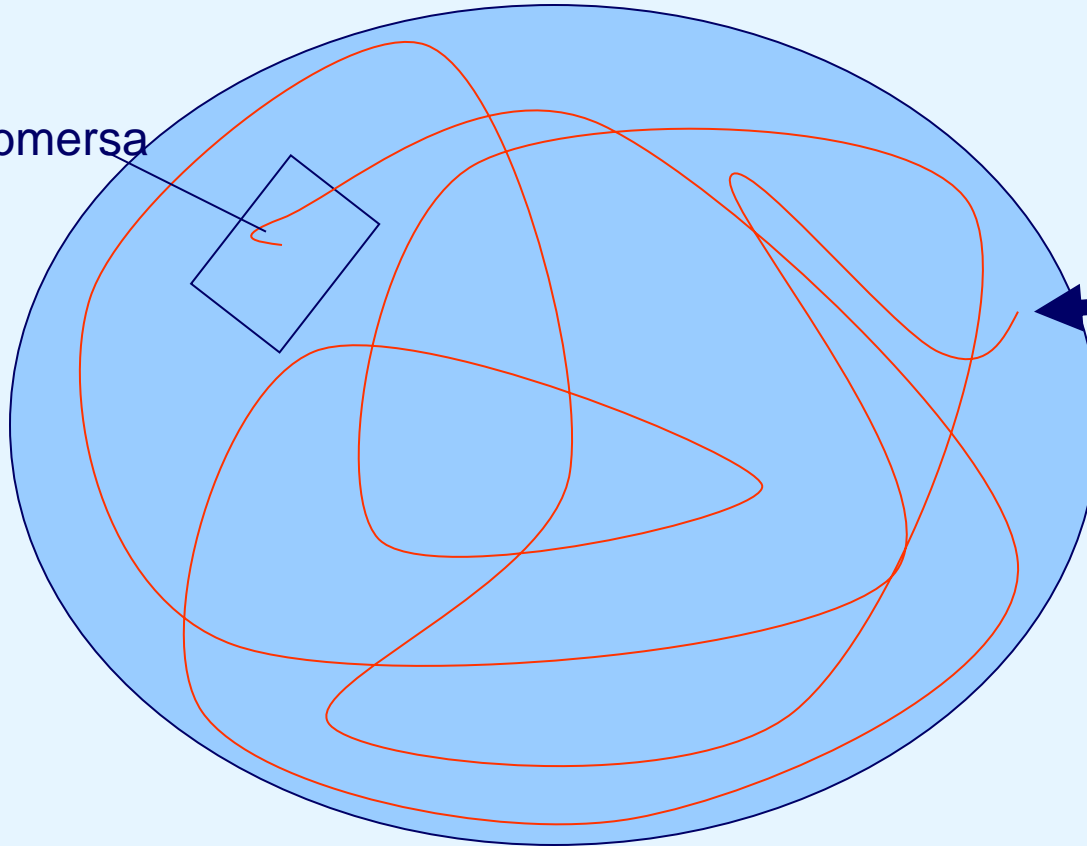


- Os leitões são liberados de pontos diferentes
- O teste encerra quando a plataforma é localizada
- Tempo máximo de 120 segundos
- Os leitões são guiados até a plataforma, caso não tenham sucesso



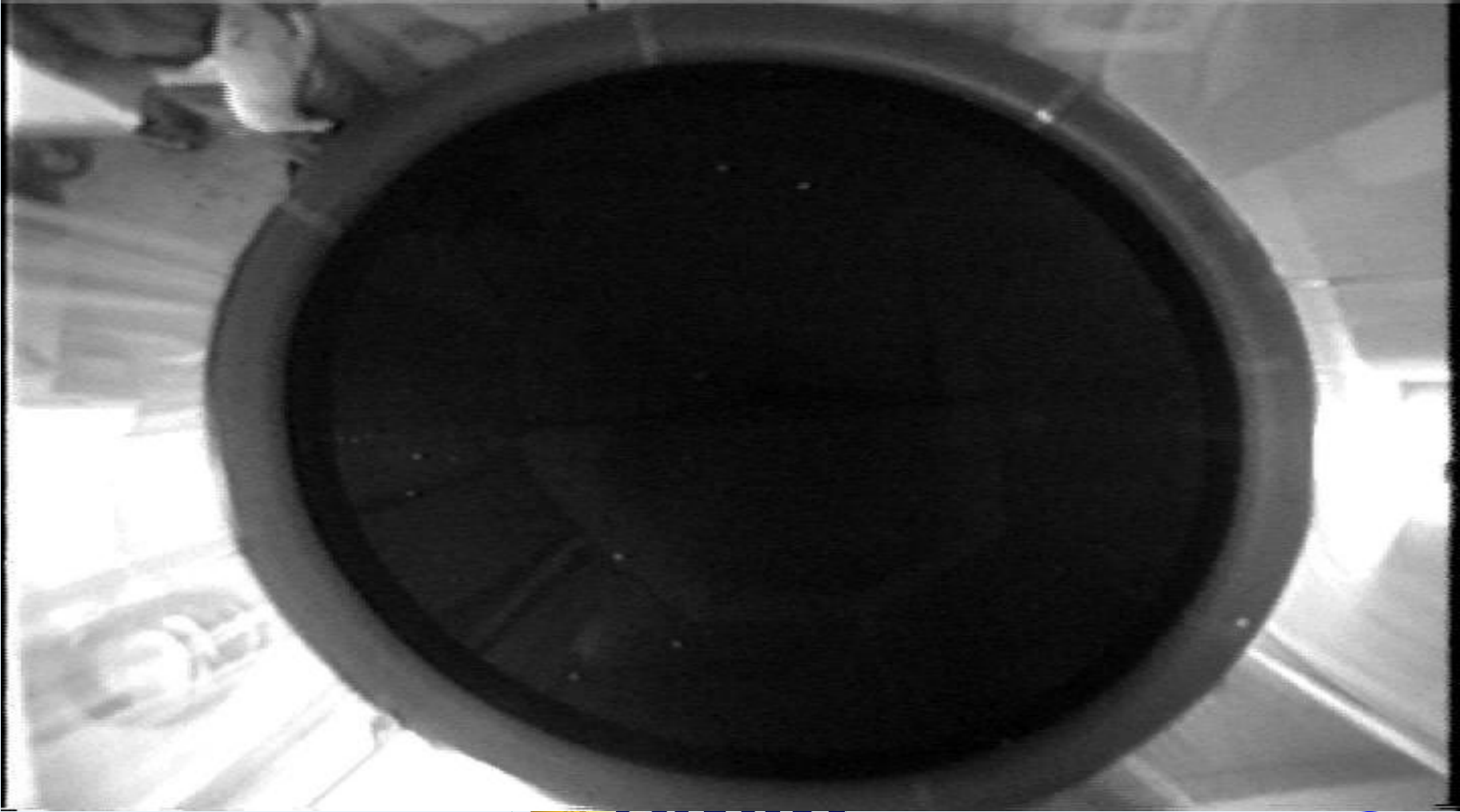


Plataforma submersa



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)



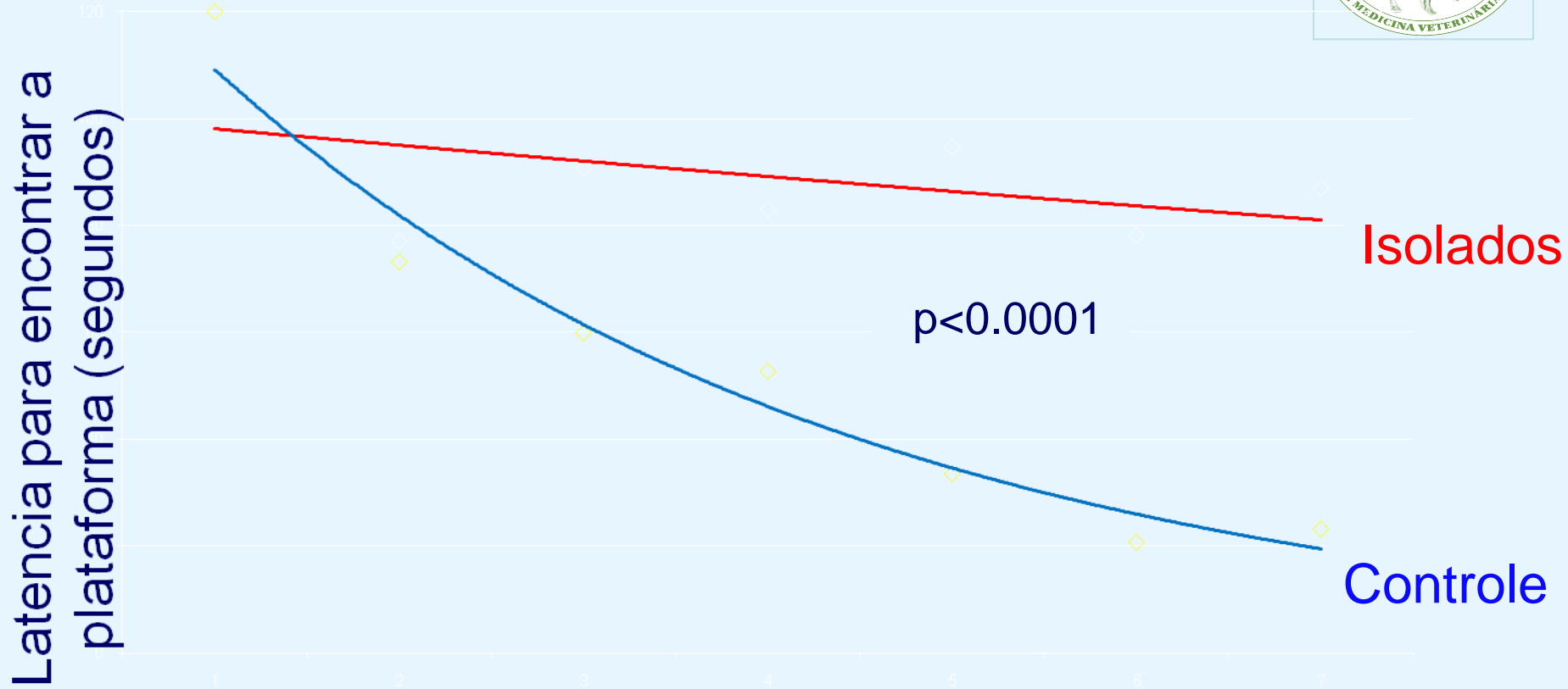
# Estresse



- Leitões foram expostos a 15 minutos de isolamento social
- Cortisol na saliva aumenta de forma significativa (estresse)



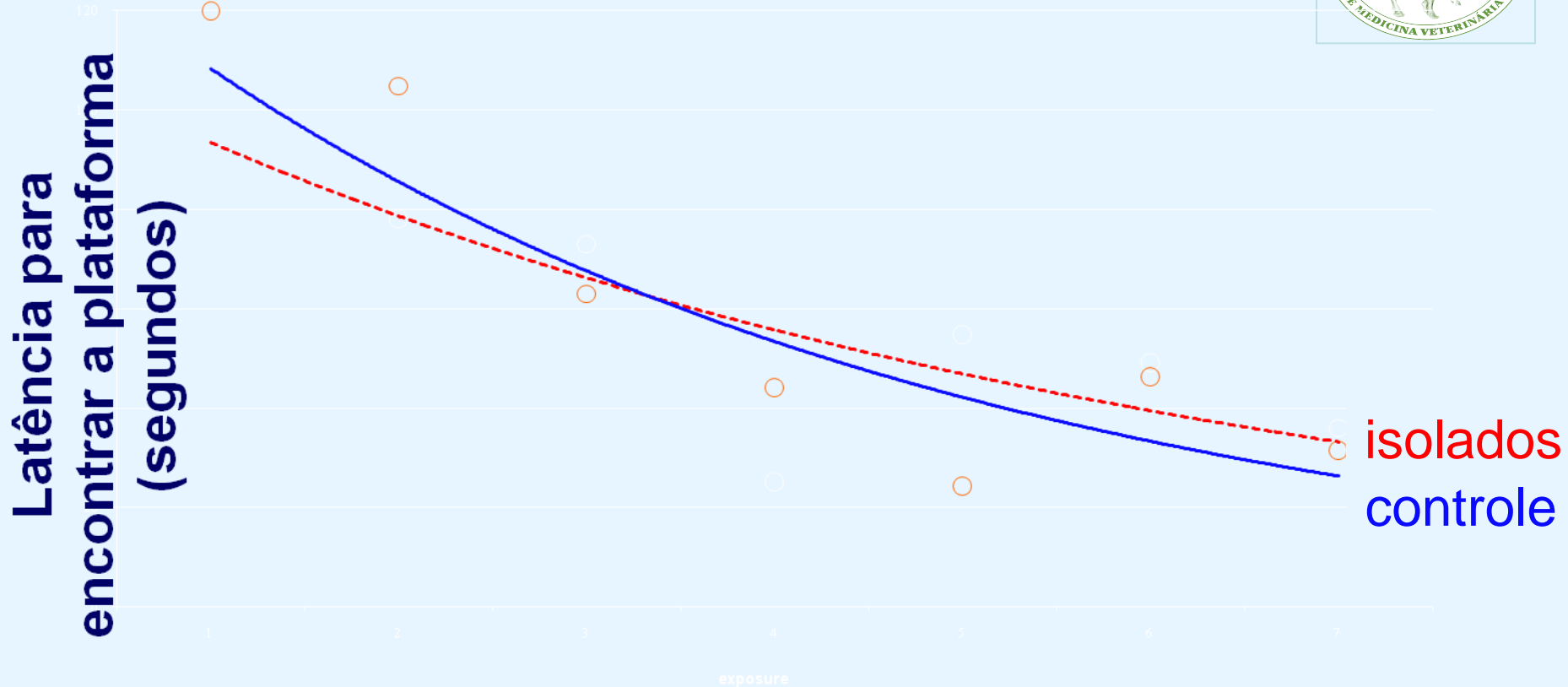
# Desmamados precocemente – d14



(Laughlin & Zanella, 2003)



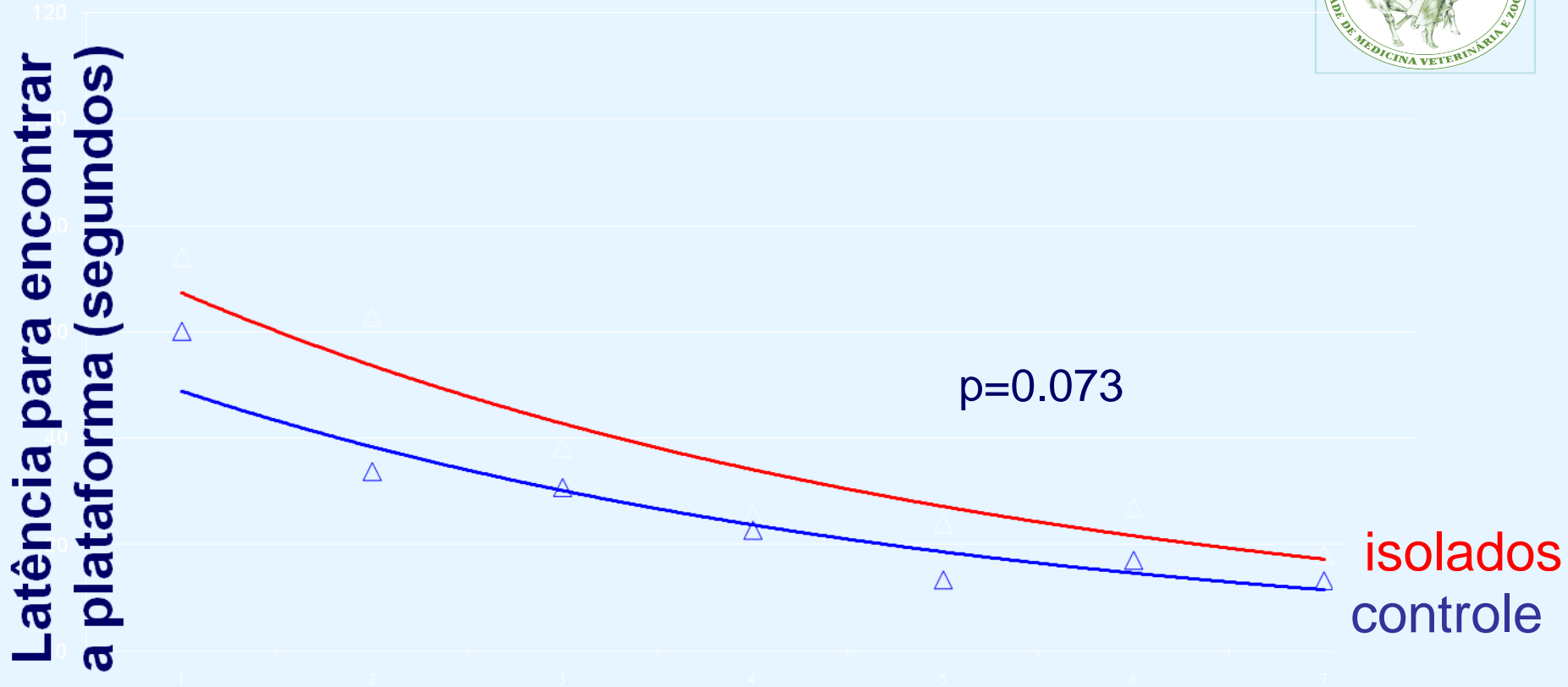
# Leitões não desmamados – d14



(Laughlin & Zanella, 2003)



# Desmamados de forma convencional — d23



(Laughlin & Zanella, 2003)





# **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 glicocorticóide **(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  
glicocorticóide 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 ( $p = 0.17$ )

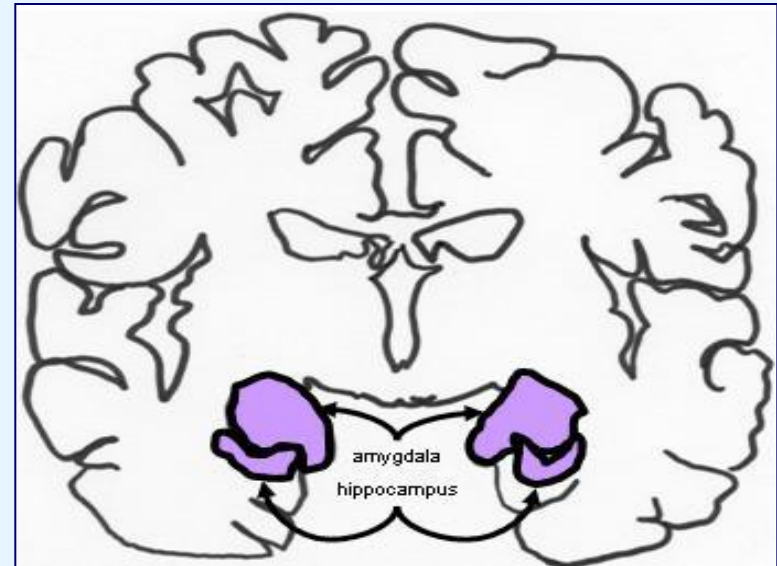
$p < 0.1 = †$ ,  $p < 0.05 = *$ ,  $p < 0.001 = ***$



# 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)

# 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, Schroeer A, Andersen IL and Zanella AJ (2011).  
Hild S\*, Coulon M\*, Schroeer 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)



» Researchers have found that the brains of lambs whose mothers experienced disruption before giving birth had changed in the regions involved in emotional regulation and cognitive processing, and the same could apply to humans. Photographs: Kimberley Powell

## Sheep reveal harm of pre-natal stress

### Unborn babies primed for lifetime of mental disorder

Fiona MacGregor

NO SHEEP were hurt in this experiment - and the benefits will be felt by pregnant women and their babies.

The research involved a team of academics from Scotland, Norway, France and the United States. Although it was carried out on pregnant ewes and their offspring, the team

journal, involved two groups of ewes in the last six weeks of pregnancy. Half were subjected to disruption of their routine and loud noises while the others were kept in a

because the template of the baby's brain can be altered.

"This is the first ever study that has proved these negative effects occur in real-world conditions. Not only that, but the ewes in the higher stress group only ever experienced very mild stress, yet we saw these

possible, and if exposed to traumatic or worrying environments, given support to get their physiology and stress hormones back to normal after stressful situations.

Low income, lack of stable relationships, and situations in which women did not have control in their lives had all

parenting may be able to reverse pre-natal changes, and the team would now be doing further research into the long-term effects of pre-birth exposure to stress.

Children's organisations said more needed to be done to help pregnant women avoid stress in their lives.

help. Employers should exercise flexibility and ensure that mothers-to-be get the time off they need and are entitled to."

Jackie Mitchell, national officer for Scotland for the Royal College of Midwives, said: "What is important is that there is good continuity of

# 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 periodo pre-natal
  - expostos a hormônios glicocorticóides
  - consequências para a expressão de gens 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

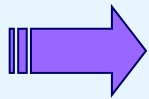
- gritos, pulos, correndo, movimentos bruscos



# Resultados



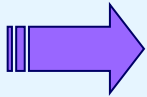
- Tendência para níveis mais elevados de cortisol em ovelhas manejadas negativamente do que as fêmeas manejadas de forma positiva



# Resultados



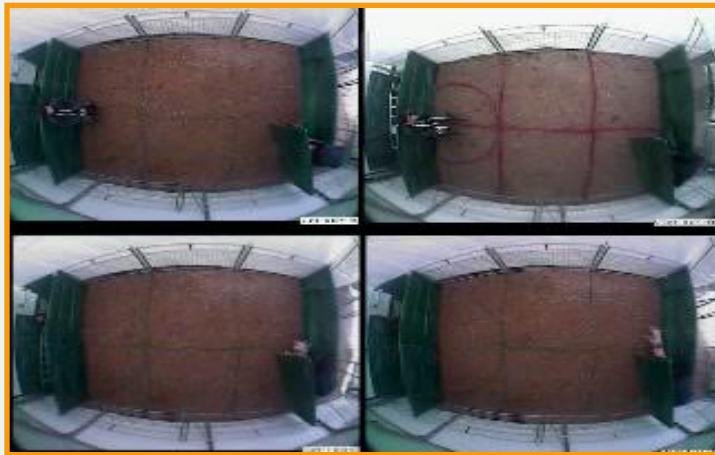
- Concentração mais elevada de cortisona na placenta de ovelhas tratadas positivamente
  - Atividade enzimática (HSD) reduzida em ovelhas tratadas negativamente ?



# 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 Schroerer, A Janczak, AJ Zanella, Physio & Behav. 2011*



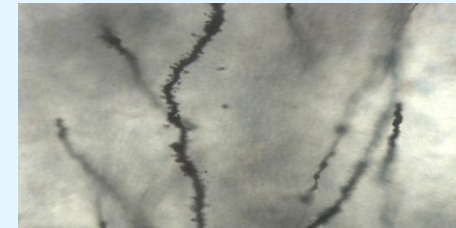
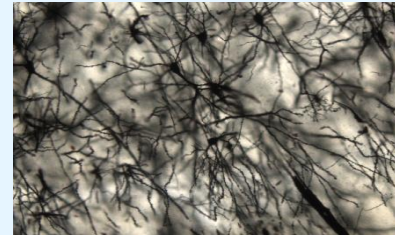
# Coulon et al.(2013)



Amostras de 5 cordeiros por tratamento foram coletadas



- Golgi-Cox
- 200  $\mu\text{m}$  do cortex frontal e hipocampo
- Slides montados e revelados
- Morfologia, arborização, estudada

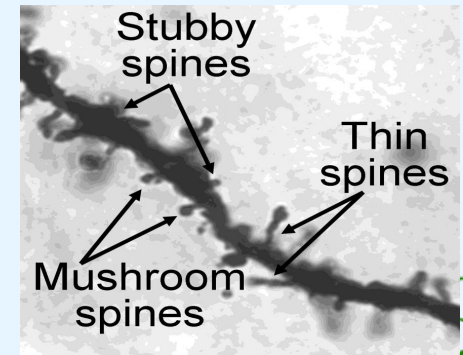
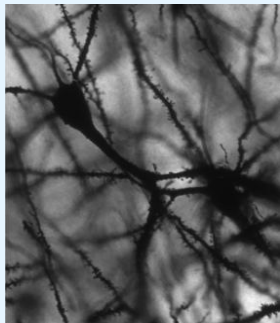


↖ Number of spines  
in dendrite of  
apical neurone

# Co Coulon et al.(2013):



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

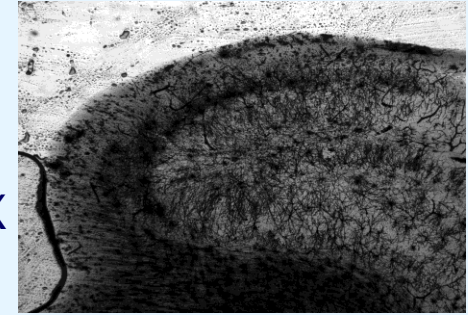


# Coulon et al.(2013)



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

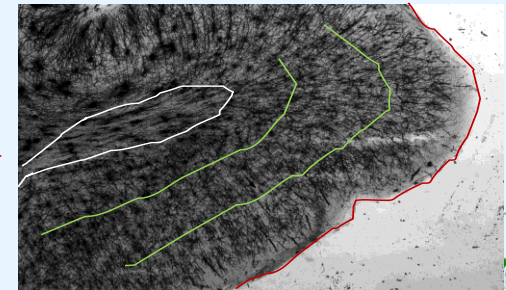
2.5 X



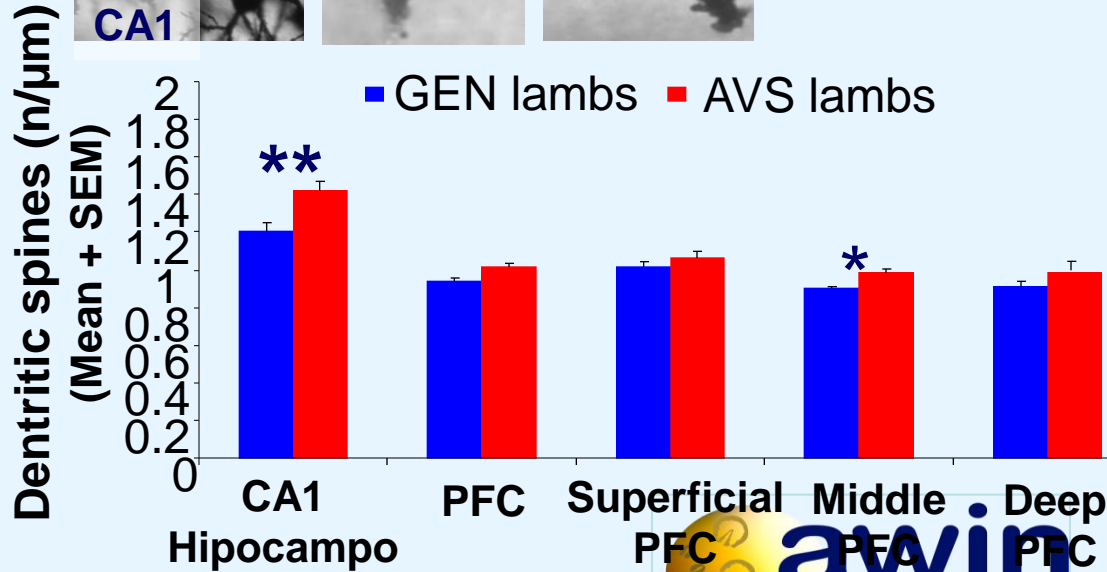
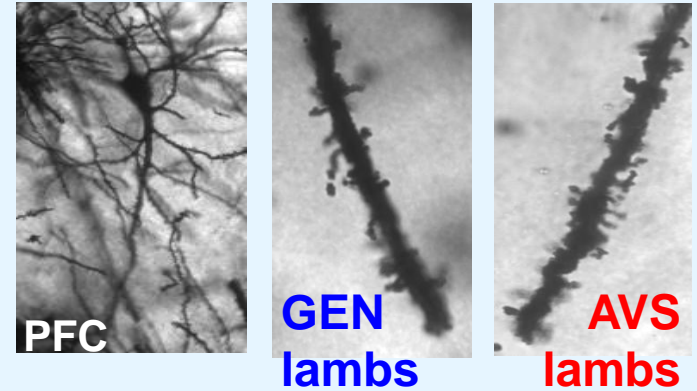
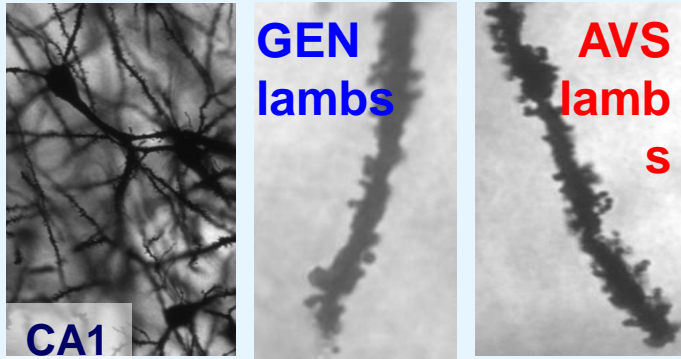
10 X



2.5 X



# Coulon et al.(2013)

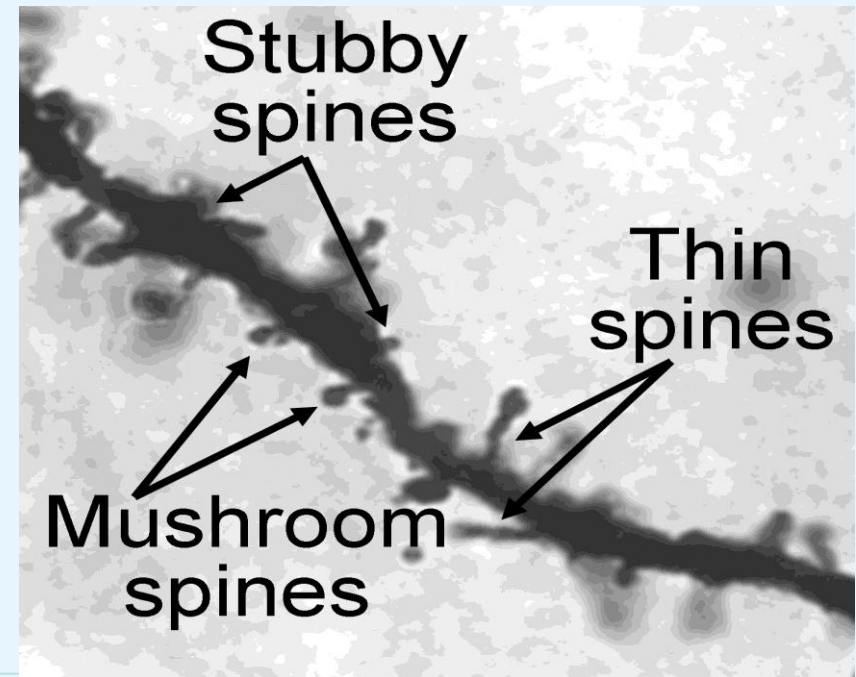


NEG cordeiros  
apresentaram maior  
densidade de pontos  
de arborização

# Coulon et al.(2013)



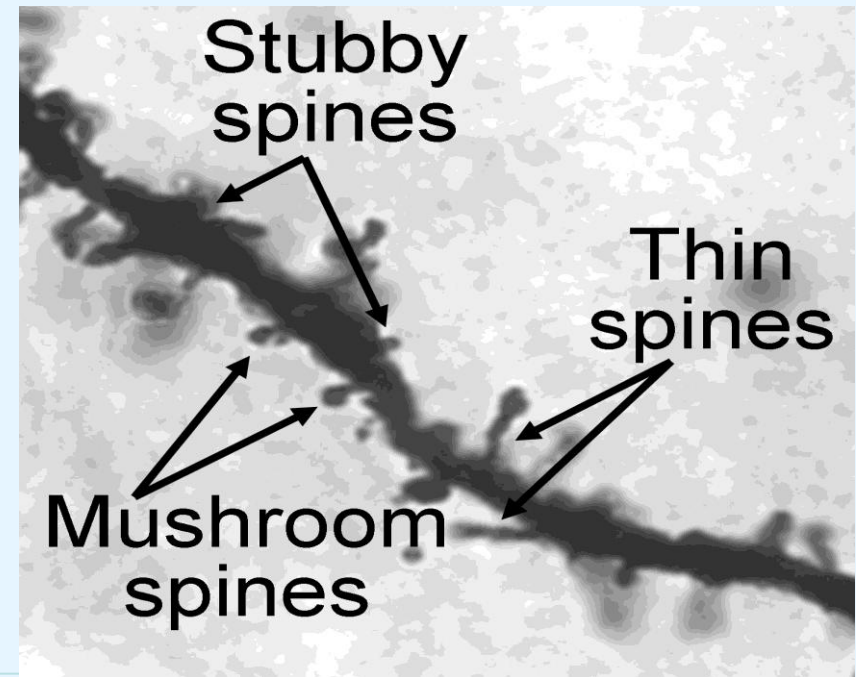
No hipocampo, **NEG** cordeiros apresentaram uma relação menor de processos de arborização tipo cogumelo (mushroom) do que os **POS** cordeiros (19% versus 25%,  $p=0.047$ ).



# 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.

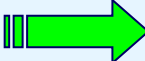




# Resumo dos resultados



- **NEG** cordeiros foram expostos a níveis mais elevados de 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 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



**MINIMO**

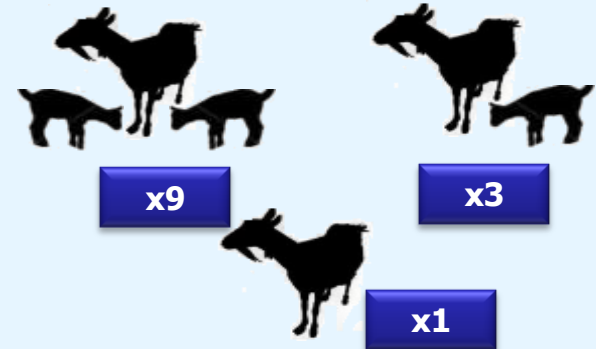
**GENTIL**

**AVERSIVO**

First scan  
(pre-trt)



Final scan  
(post-trt)



**Sem  
mudança**

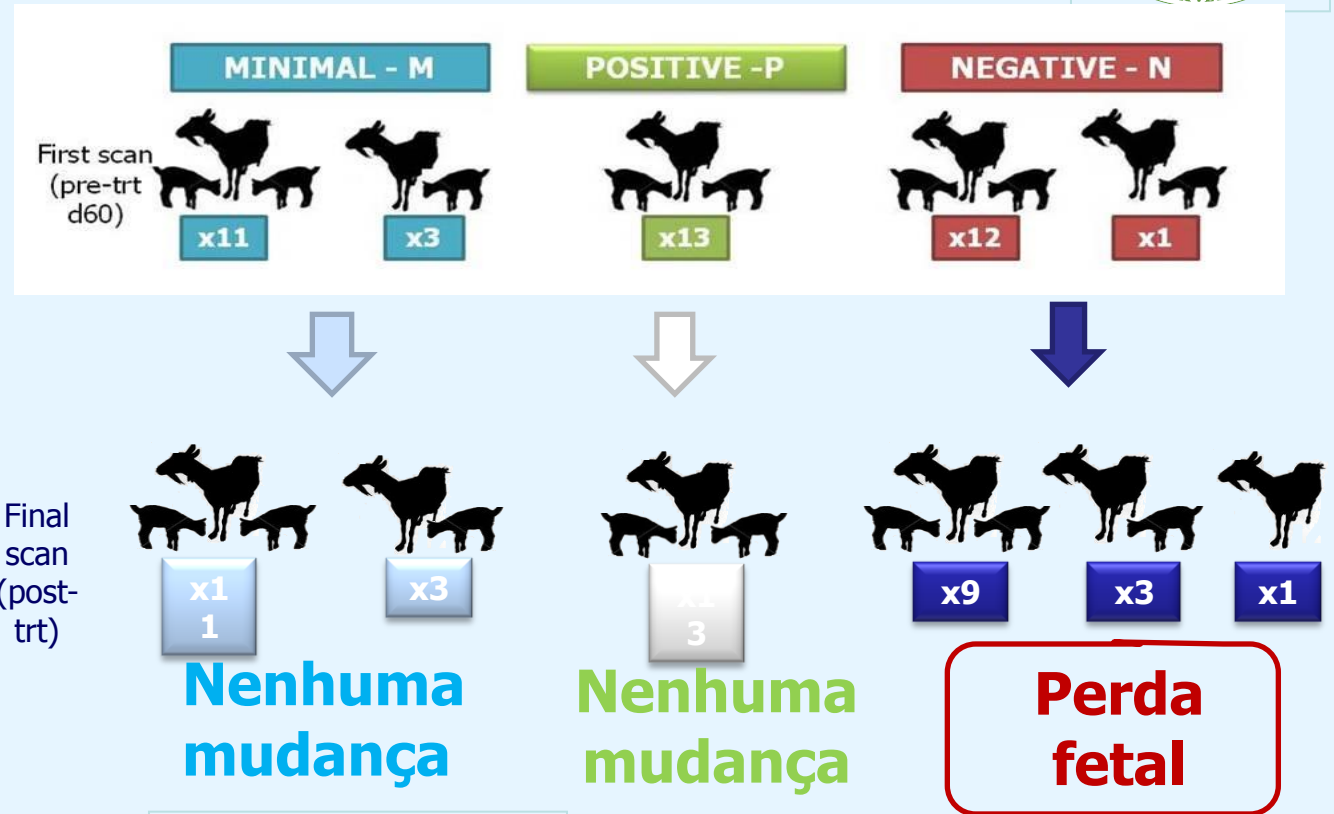
**Sem  
mudança**



# Baxter et al., 2016



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

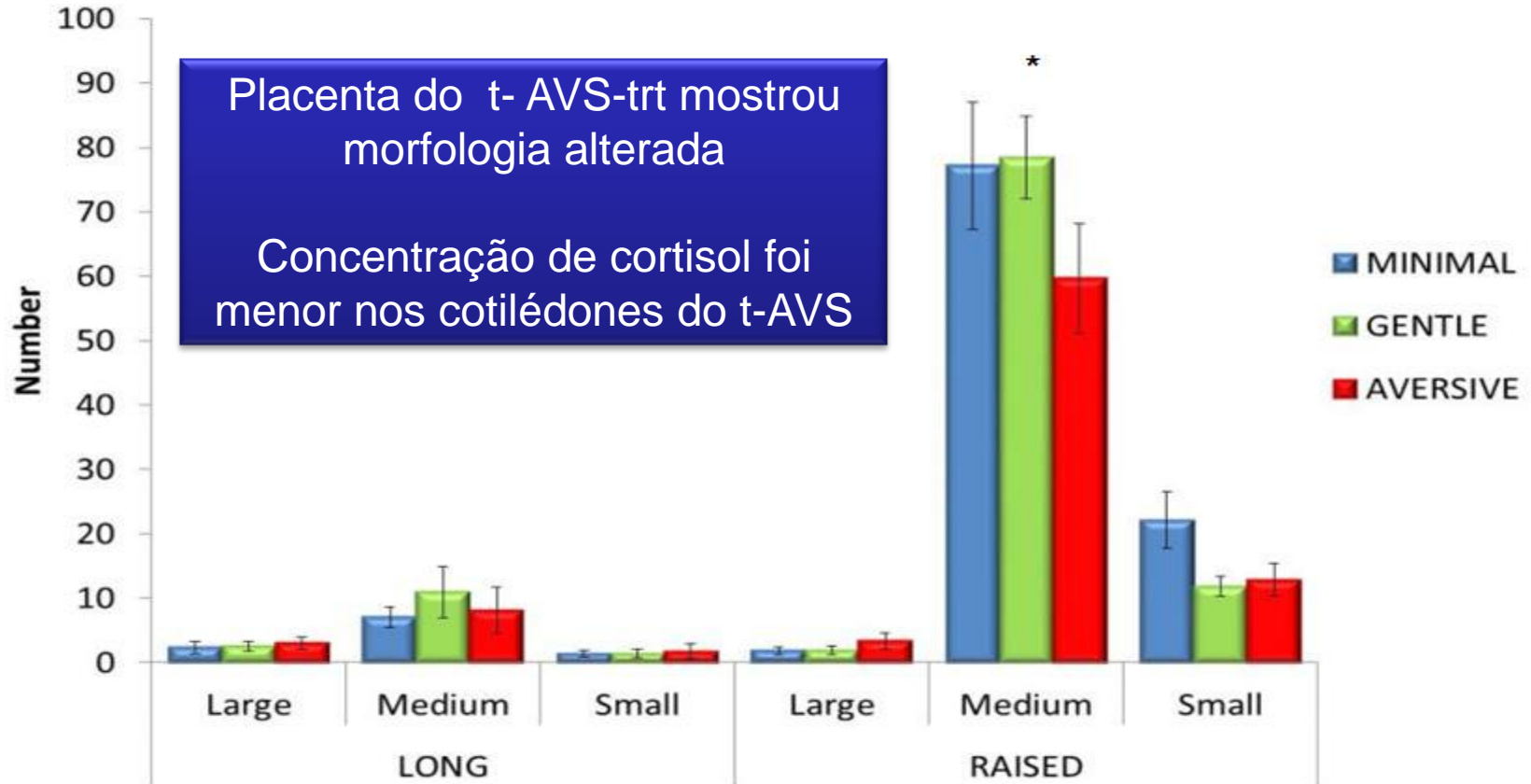




# Resultados-placenta



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?



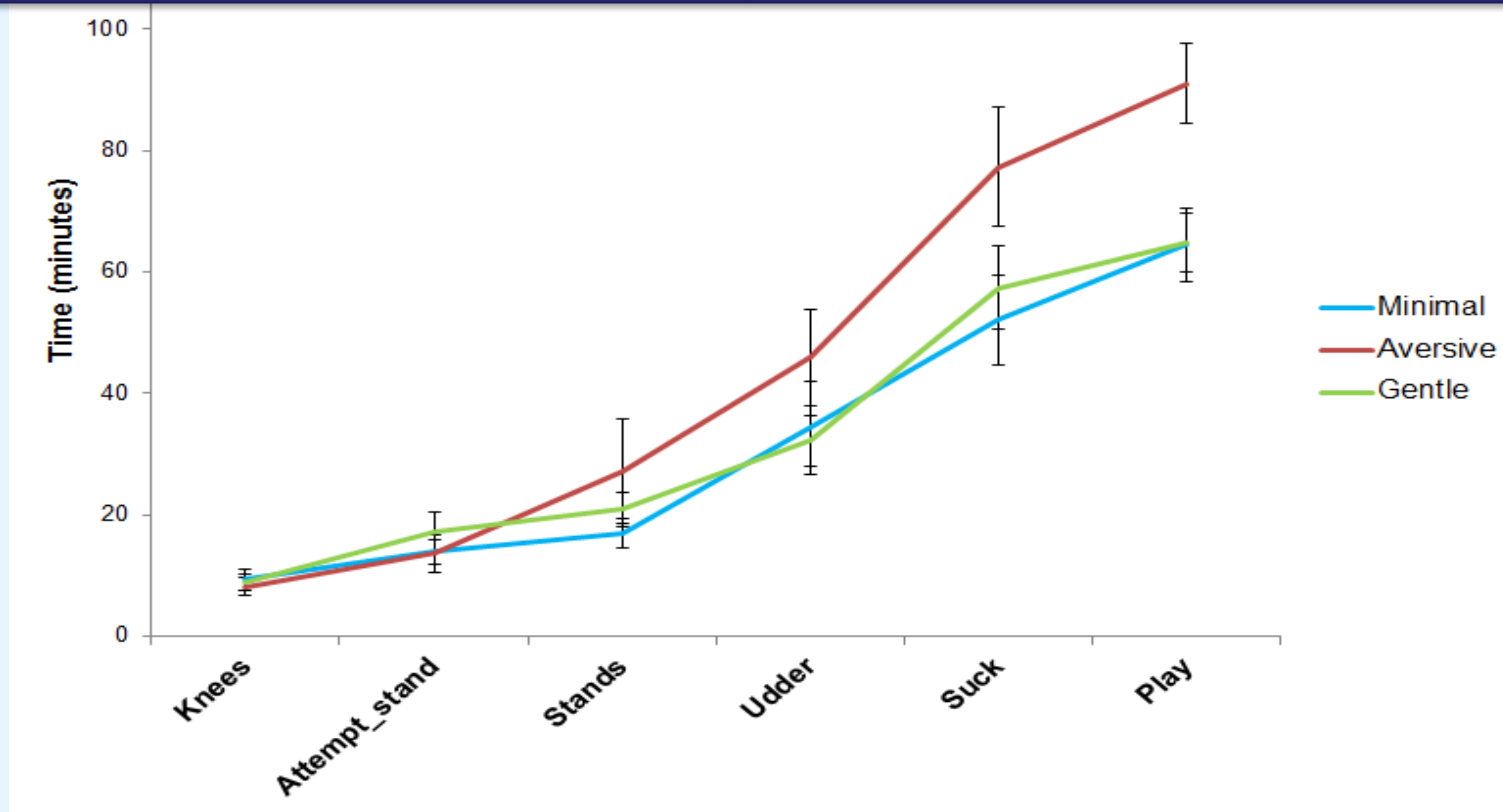
# Mensuração de comportamento



# Resultados: comportamento



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



# Implicações

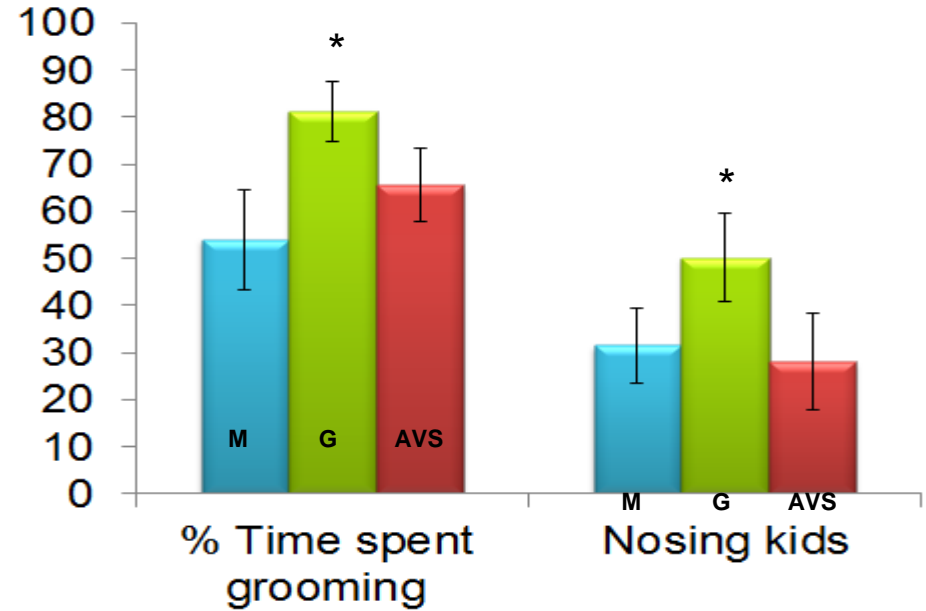


- Os neonatos mais rápidos tem acesso ao úbere, alimentação e cuidado de forma mais efetiva (colostro, energia, termoregulação)
- Qual é o significado de “brincar”?
  - Desenvolvimento da coordenação
  - Indicador de bem-estar

# Comportamento materno



## Grooming and nosing behaviour for first 2hrs post-birth



# 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



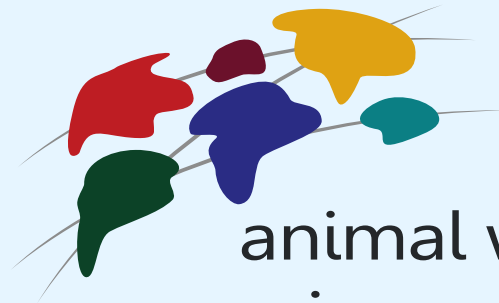
- Marjorie Coulon
- Sophie Hild
- Adriana de Souza
- Kirsty Laughlin
- Rosangela Poletto
- Emma Baxter
- Paul Coussens
- USDA
- Norwegian Research Council
- DG Research (FP7 AWIN Project)



Obrigado!



adroaldo.zanella@usp.br



animal welfare  
science hub

<http://www.animalwelfarehub.com>

