

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

STENIA SEVERO RABELO

**DESMAME PRECOCE EM LEITÕES: ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO
CORPORAL, EPIGENÉTICA E COMPORTAMENTAL**

Uberlândia - MG

2023

STENIA SEVERO RABELO

**DESMAME PRECOCE EM LEITÕES: ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO
CORPORAL, EPIGENÉTICA E COMPORTAMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Produção Animal

Orientador: Prof. Dr. Robson Carlos Antunes

Uberlândia - MG

2023

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R114 Rabelo, Stenia Severo, 1989-
2023 Desmame precoce em leitões: Estudo do desenvolvimento corporal, epigenética e comportamental [recurso eletrônico] / Stenia Severo Rabelo. - 2023.

Orientador: Robson Carlos Antunes.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2023.134>

Inclui bibliografia.

1. Veterinária. I. Antunes, Robson Carlos, 1968-,
(Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-
graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

STENIA SEVERO RABELO

**DESMAME PRECOCE EM LEITÕES: ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO
CORPORAL, EPIGENÉTICA E COMPORTAMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Produção Animal.
Orientador: Prof. Dr. Robson Carlos Antunes

Uberlândia, 24/02/2023

Banca Examinadora:

Dr. Robson Carlos Antunes (UFU)

Dr. Mauricio Machaim Franco (UFU/Embrapa)

Dra. Amanda Marchi Maiorano (UFU)

Dr. Thiago Bernardino de Almeida (UNISA)

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo (UFLA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias
BR 050, Km 78, Campus Glória , Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO PPGCVET Nº 01/2023				
Data:	24/02/2023	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	19:30
Matrícula do Discente:	11913VET013				
Nome do Discente:	STENIA SEVERO RABELO				
Título do Trabalho:	DESMAME PRECOCE EM LEITÕES: ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO CORPORAL, EPIGENÉTICA E COMPORTAMENTAL				
Área de concentração:	PRODUÇÃO ANIMAL				
Linha de pesquisa:	FORRAGICULTURA, MANEJO E EFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO DOS ANIMAIS E SEUS DERIVADOS				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA DOS FATORES QUE AFETAM E INFLUENCIAM O DESEMPENHO E EFICIÊNCIA DOS SUÍNOS NAS VÁRIAS FASES DE PRODUÇÃO E QUALIDADE DA CARÇAÇA E CARNE				

Reuniu-se na sala 1CCG 216, Campus Glória, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Senhores(as): Maurício Machaim Franco - EMBRAPA; Amanda Marchi Maiorano - FAMEV/UFU; Thiago Bernardino de Almeida - UNISA; Márcio Gilberto Zangeronimo - UFLA e Robson Carlos Antunes - FAMEV/UFU, orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Robson Carlos Antunes, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e

achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Robson Carlos Antunes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2023, às 19:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Marchi Maiorano, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/02/2023, às 19:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Bernardino de Almeida, Usuário Externo**, em 24/02/2023, às 19:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maurício Machaim Franco, Usuário Externo**, em 24/02/2023, às 19:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcio Gilberto Zangeronimo, Usuário Externo**, em 27/02/2023, às 11:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4208797** e o código CRC **3AFA1F04**.

Dedico este trabalho a minha família,
especialmente ao Wilson e Marilda.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais Wilson e Marilda, por todo amor, carinho e dedicação. O início do doutorado não foi fácil, mas os esforços de vocês pela minha educação não foram em vão. Vocês são os principais incentivadores deste trabalho, e as pessoas mais importantes da minha vida. Eu amo vocês infinitamente.

Agradeço ao meu marido Guilherme Henrique pela compreensão, amor e por querer sempre o meu melhor. Obrigada por tudo que você faz por mim. Te amo muito.

Agradeço à minha irmã Maysa e sobrinha Dandara por tudo que vocês representam para mim, e por fazerem parte da minha vida.

Agradeço ao professor e amigo Robson Antunes pela oportunidade, paciência e orientação neste curso. Obrigada pela confiança e incentivo desde 2017, no nosso encontro em Jaboticabal.

Às famílias Severo e Rabelo, obrigada por todo vínculo e carinho. Agradeço também aos meus amigos de Patos de Minas-MG e Lavras-MG por todo companheirismo.

Agradeço à Granja Cinco Estrelas pela possibilidade de realização do trabalho, em especial ao Antônio Liomar e Luiz, pela troca de experiências e ajuda.

Agradeço à Suinco pela oportunidade de coleta de material do experimento, em especial à Jéssica Luana e Jéssica Borges por todo auxílio e disponibilidade.

Agradeço à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, ao Maurício Machaim, Thainara e Luna, por todo conhecimento compartilhado, paciência e fornecimento de materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço também ao Thiago Bernardino e professor Adroaldo (USP-Pirassununga), por todo auxílio e orientação.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante dois anos do curso de doutorado.

Agradeço também ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFU, em especial aos professores Ednaldo, Ricarda e Daise.

Gratidão a Deus pela vida e força!

“Coração de estudante,
Há que se cuidar da vida,
Há que se cuidar do mundo,
Tomar conta da amizade.”

(Milton Silva Campos Do Nascimento e Wagner Tiso Veiga, 1999)

RESUMO

A hiperprolificidade da fêmea suína alcançada através do melhoramento genético permite maior rentabilidade ao produtor devido ao aumento da eficiência da matriz e elevado número de leitões desmamados/fêmea/ano. Porém, existe um desequilíbrio entre o maior número de leitões nascidos e a capacidade da matriz em atender às necessidades nutritivas da sua prole. Portanto, desafios existem na fase de lactação, como a exigência da fêmea ser maior do que sua capacidade fisiológica de adquirir nutrientes. Diante disso, o desmame precoce aliado à utilização de sucedâneos de leite tornam-se uma alternativa para compensar essa disparidade. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo mensurar o desempenho animal e as alterações comportamentais e neuroendócrinas em suínos desmamados precocemente, com o intuito de medir a aceitabilidade dessa prática em termos de bem-estar animal. A tese foi dividida em cinco capítulos, sendo o primeiro referente às considerações gerais relacionados ao tema, e o segundo relacionado às técnicas e análises usadas no trabalho. No capítulo três, objetivou-se avaliar o desempenho produtivo do desmame precoce aos dez dias de idade, e comparar com o desmame convencional da granja aos 21 dias de idade. O delineamento do experimento foi em seis blocos casualizados com 24 repetições, e dois tratamentos. O grupo controle foi o desmame convencional utilizado na granja, aos 21 dias, e o grupo tratamento considerou o desmame precoce aos dez dias de idade. Foram avaliados os pesos do nascimento até o final do ciclo produtivo da granja, e no frigorífico, foi analisado o rendimento da carcaça. Os leitões desmamados aos 21 dias de idade manifestaram maiores potenciais de crescimento se comparados com animais com dez dias, e a carcaça desses animais apresentaram maior profundidade de músculo e peso. Conclui-se que o desmame precoce induziu efeitos deletérios intensos sobre a fisiologia e o desenvolvimento dos leitões. No capítulo quatro, foi avaliado o comportamento dos animais através da mensuração de lesões no desmame aos dez dias em diferentes momentos, teste do campo aberto e objeto novo aos 21 dias, e tempo de embarque dos animais para o transporte até o frigorífico. Foi coletado o hipocampo no frigorífico e analisados os efeitos epigenéticos do gene *NR3C1* e de expressão dos genes relacionados ao estresse, sendo eles o *NR3C1*, *NR3C2*, *FKBP5*, *HTR1A* e *BDNF*. Como resultado, os suínos desmamados aos dez dias de idade aumentaram a quantidade de lesões e agressividade às 24 e 48 horas após o desmame. Nos testes do campo aberto e objeto novo, esses animais desmamados precocemente demonstram maior habituação. Além disso, não houve alteração epigenética na região do exon 1(7) do gene *NR3C1*, e não houve diferença significativa entre os grupos na expressão de genes estudados relacionados ao estresse. Sugere-se que possa ter

ocorrido pelos cuidados maternos até os dez dias de idade serem suficientes para não provocar alterações epigenéticas e de expressão gênica nos animais. O último capítulo desse trabalho refere-se às considerações finais, com a síntese e perspectiva da hiperprolificidade da fêmea suína e os manejos alternativos para leitegadas numerosas.

Palavras-chave: Bem-estar animal; comportamento animal; desempenho; expressão gênica; hiperprolificidade; suinocultura.

ABSTRACT

The hyperprolificity of the female swine achieved through genetic improvement allows greater profitability for the producer due to the increase in the efficiency of the sow and the high number of piglets weaned/female/year. However, there is an imbalance between the greater number of piglets born and the sow's ability to meet the nutritional needs of her offspring. Therefore, challenges exist in the lactation phase, such as the demand of the female being greater than her physiological capacity to acquire nutrients. Therefore, early weaning combined with the use of milk substitutes become an alternative to compensate for this disparity. Therefore, the present study aimed to measure animal performance and behavioral and neuroendocrine changes in early weaned pigs, in order to measure the acceptability of this practice in terms of animal welfare. The thesis was divided into five chapters, the first referring to general considerations related to the theme, and the second related to the techniques and analyzes used in the work. In chapter three, the objective was to evaluate the productive performance of early weaning at ten days of age, and to compare it with conventional weaning on the farm at 21 days of age. The experimental design was in six randomized blocks with 24 repetitions, and two treatments. The control group was the conventional weaning used on the farm, at 21 days, and the treatment group considered early weaning at ten days of age. Weights from birth to the end of the farm's production cycle were evaluated, and in the slaughterhouse, carcass yield was analyzed. Piglets weaned at 21 days of age showed greater growth potential compared to animals aged 10 days, and the carcass of these animals showed greater muscle depth and weight. It is concluded that early weaning induced intense deleterious effects on the physiology and development of piglets. In chapter four, the behavior of the animals was evaluated by measuring lesions at weaning at ten days at different times, open field test and new object at 21 days, and time of loading the animals for transport to the slaughterhouse. The hippocampus was collected in the refrigerator and the epigenetic effects of the NR3C1 gene and the expression of stress-related genes were analyzed, namely NR3C1, NR3C2, FKBP5, HTR1A and BDNF. As a result, pigs weaned at ten days of age increased the amount of lesions and aggressiveness at 24 and 48 hours after weaning. In the open field and new object tests, these early weaned animals show greater habituation. Furthermore, there was no epigenetic alteration in the region of exon 1(7) of the NR3C1 gene, and there was no significant difference between the groups in the expression of the genes studied related to stress. It is suggested that it may have occurred due to maternal care until ten days of age were sufficient to not cause epigenetic and gene expression changes in the animals. The last chapter of this work refers to the final considerations, with the synthesis and

perspective of the hyperprolificity of the female swine and the alternative managements for numerous litters.

Keywords: Animal welfare; animal behavior; performance; gene expression; hyperprolificity; swine farming.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO IV

Figura 1. Padrões de metilação dos grupos experimentais.....	98
Figura 2. Comparação de padrão de metilação entre machos e fêmeas dos tratamentos	99
Figura 3. Comparação de padrão de metilação entre controle e tratamento, nos diferentes gêneros	99
Figura 4. <i>Boxplot</i> dos valores de <i>ratio</i> por gene-tratamento	101
Figura 5. <i>Boxplot</i> dos valores de <i>ratio</i> por gene.....	101
Figura 6. <i>Boxplot</i> dos valores de <i>ratio</i> por tratamento.....	102
Figura 7. Gráfico de interação entre gene e tratamento	102

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III

Table 1. Description of elements in substitute A and B.....	73
Table 2. Supply of milk substitutes	74
Table 3. Average weights of animals.....	76
Table 4. Averages of animal weight gains	76
Table 5. Means of slaughterhouse data.....	77

CAPÍTULO IV

Tabela 1. <i>Primers</i> para análise de metilação do DNA.....	91
Tabela 2. Sequências dos <i>primers</i> para amplificação de RNAm por RT-qPCR.....	95
Tabela 3. Médias do número de lesões em diferentes dias próximo ao desmame	96
Tabela 4. Teste do campo aberto e objeto novo aos 21 dias de idade	96
Tabela 5. Tempo de embarque dos animais para o transporte até o frigorífico	97
Tabela 6. Razão de todos os tratamentos em comparação com o M-C (base de comparação)	100
Tabela 7. Resultado das comparações múltiplas dos grupos de comparação	103

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Certificado de aprovação para realização do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	118
Anexo 2. Quantidade de ilhas CpG, em verde, do gene <i>NR3C1</i>	119
Anexo 3. Local dos <i>primers outer</i> (<i>forward</i> e <i>reverse</i>) em verde, e local dos <i>primers inner</i> (<i>forward</i> e <i>reverse</i>) em amarelo	119

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Celsius
5-HT	Serotonina
5mC	5-metil-citosina
ABCS	Associação Brasileira dos Criadores de Suínos
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AMPC	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
<i>BDNF</i>	Gene do fator neurotrófico derivado do cérebro
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CpG	Citosina-fosfato-Guanina
CRF	Fator de liberação de corticotrofina
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Desoxirribonuclease
DNMTs	DNA Metiltransferases
DNPs	Dias não produtivos
ECOR1	Enzima de restrição recombinante proveniente de <i>E. coli</i> ry13
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<i>FKBP5</i>	Prolil Isomerase 5-gene codificador da proteína FKBP51
G	Força G - Centrífuga Relativa
g	Gramas
GR	Receptor de Glicocorticoides
HCl	Ácido clorídrico
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
<i>HTR1A</i>	Gene codificador de receptores serotoninérgicos 5HT-1 ^a
IDC	Intervalo de desmame-estro
IN 113	Instrução Normativa número 113
IPTG	Isopropil- β -Dtiogalactopiranosídeo
Kg	Quilogramas

LB	Meio Luria-Bertani
M	Molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligramas
MG	Minas Gerais
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
miRNA	Micro RNA
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MR	Receptor de Mineralocorticoides
NaCl	Cloreto de sódio
ncRNAs	RNA não-codificante
NGFI-A	Fator de crescimento do nervo I
<i>NR3C1</i>	Gene codificador de receptores de glicocorticoides
<i>NR3C2</i>	Gene codificador de receptores de mineralocorticoides
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PKA	Proteína quinase A dependente de cAMP
pmol	Picomol
qPCR	PCR em Tempo Real
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
UI	Unidade Internacional
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo
$\Delta\Delta C_t$	Método de ciclos totais comparativos
μ l	Microlitro

SUMÁRIO

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	21
1 INTRODUÇÃO	22
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral.....	23
2.2 Objetivos específicos.....	23
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	24
3.1 Alternativas para leitões supranumerários.....	24
3.1.1 Desmame precoce e suplemento lácteo	26
3.1.2 Mães de leite	28
3.1.3 Confinamento temporário e lactação coletiva.....	29
3.2 Desmame precoce e desempenho da matriz e dos leitões	31
3.3 O cuidado materno nos primeiros dias de vida do animal.....	33
3.4 Comportamento de animais desmamados precocemente	34
3.5 Efeitos do desmame precoce e descuido materno sobre perfis epigenéticos e de expressão gênica	36
3.6 Bem-estar animal	40
REFERÊNCIAS	41
CAPÍTULO II – DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS E ANÁLISES DESENVOLVIDAS NO EXPERIMENTO SOBRE O DESMAME PRECOCE.....	52
1 INTRODUÇÃO	53
2 ANÁLISE DE LESÕES CUTÂNEAS NOS ANIMAIS	53
3 TESTE DO CAMPO ABERTO.....	54
4 TESTE DO OBJETO NOVO	55
5 TEMPO DE EMBARQUE	56
6 ANÁLISES EPIGENÉTICAS	57

6.1	Extração de DNA pelo método de “ <i>salting-out</i> ”	58
6.2	Tratamento do DNA com bissulfito de sódio	58
6.3	Análise da metilação do DNA	59
7	EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL.....	62
	REFERÊNCIAS	65
	CAPÍTULO III – EFFECT OF EARLY WEANING OF PIGLETS AT 10 DAYS OF AGE ON PRODUCTIVE PERFORMANCE.....	69
	CAPÍTULO IV – ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROENDÓCRINAS DE LEITÕES DESMAMADOS PRECOCEMENTE AOS 10 DIAS DE IDADE	82
	CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	115
	ANEXOS.....	118

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um importante produtor mundial de carne suína. Segundo o relatório de 2022 da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), no ano de 2021, o país produziu um valor bruto de 31,394 bilhões de reais, com uma produção de 4,701 milhões de toneladas de carne suína. Os estados brasileiros que mais produziram, em ordem crescente, foram: Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e Minas Gerais. O destino da produção da carne suína foi 75,81% consumidos no mercado interno e 24,19% destinado ao mercado externo, sendo que o Brasil se destaca na quarta posição quanto às exportações. Os principais destinos da exportação da carne suína brasileira são China, Hong Kong, Chile, Singapura, Vietnã e Uruguai (ABPA, 2022).

Os números expressivos da produção suinícola brasileira resultaram de diversos progressos da seleção genética dos animais, desempenho produtivo em cada fase de produção, aperfeiçoamento das técnicas reprodutivas, atenção voltada à sanidade, além de manejos adequados para intensificar a produção. O melhoramento genético animal é um dos principais pontos para desenvolver bons índices na produção animal, como a eficiência alimentar e maior taxa de crescimento, e aumento da capacidade reprodutiva de fêmeas.

A hiperprolificidade é caracterizada pelo aumento da capacidade de ovulação da fêmea e fecundação, com consequente aumento do número de leitões desmamados por matriz/ano. O aumento da leitegada foi alcançado através da seleção de material genético de fêmeas hiperprolíficas de raças puras, em Landrace e Large White, e linhas sintéticas do cruzamento de Landrace, Large White e outras raças com uma ou mais raças chinesas de suínos de alta prolificidade, como a Meishan (ABCS, 2014). Essa última, de origem chinesa apresentam fetos que ocupam menor espaço uterino, possibilitam maior sobrevivência embrionária, e consequentemente, produzem um maior número de leitões (CHRISTENSON et al., 1993).

O maior número de leitões desmamados/fêmea/ano é um critério de seleção usado para aumentar a produtividade de suínos, mas ocasiona desafios durante a lactação. Na suinocultura, a produção de leite é tema discutido amplamente uma vez que as fêmeas não conseguem produzir leite em quantidade suficiente para sustentar um ótimo crescimento dos seus leitões. Outros desafios decorrentes do aumento de leitões nascidos de fêmeas hiperprolíficas são menor peso médio ao nascimento, maior heterogeneidade de pesos e maior porcentagem de leitões com peso leve na fase de maternidade. Portanto, desafios da leitegada numerosa devem ser

estudados criteriosamente, para que a hiperprolificidade não seja obstáculo na produção de suínos.

Existem alternativas para que os leitões lactentes advindos de leitegadas numerosas possam se desenvolver e ter bom desempenho nas fases de maternidade, creche, crescimento e terminação. Esses animais tendem a consumir menos leite ocasionado pela menor produção da matriz e pela maior disputa dos tetos. No entanto, o desmame precoce combinado com o fornecimento de sucedâneo do leite, pode ser uma forma de melhorar a taxa de sobrevivência e o peso ao desmame (ZIJLSTRA et al., 1996; MADSEN et al., 2018). Ademais, também é necessário averiguar como esta técnica compromete o bem-estar animal, pois há indícios de que a prática do desmame precoce pode diminuir a qualidade de vida dos animais. Além disso, existe uma pressão internacional no que se refere ao tratamento e conforto dos animais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar leitões desmamados aos dez dias de idade com inclusão de um sucedâneo de leite e comparar com o desmame convencional de 21 dias em granja comercial, por meio de análise do desempenho produtivo, comportamento e possíveis alterações do sistema nervoso.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do estudo foram:

- Acompanhar o desempenho produtivo dos animais desmamados aos dez e aos 21 dias em relação ao ganho de peso, do nascimento, aos dez, 21, 66 até os 163 dias de idade;

- Verificar o rendimento de carcaça no frigorífico de animais desmamados precocemente, com análise do peso da carcaça quente, espessura de toucinho e espessura de músculo e porcentagem de carne magra;
- Analisar o medo e estresse dos animais através de testes comportamentais, como avaliação do número de lesões corporais, teste do campo aberto e objeto novo, e tempo de embarque dos animais para o transporte até o frigorífico;
- Estudar possíveis alterações epigenéticas do gene *NR3C1* (codificador de receptores de glicocorticoides) do hipocampo de leitões sobre o cuidado materno de fêmeas suínas até os dez dias de idade, e comparar com leitões que permaneceram junto à mãe até os 21 dias de idade;
- Analisar a expressão de genes relacionados ao estresse em amostras do hipocampo, sendo eles, *NR3C1*, *NR3C2* (codificador de receptores de mineralocorticoides), *FKBP5* (envolvido com a sensibilidade dos receptores de glicocorticoides - GR ao cortisol), *HTR1A* (codificador de receptores serotoninérgicos 5HT-1a) e *BDNF* (codificador do fator neurotrófico derivado do encéfalo).

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Alternativas para leitões supranumerários

A obtenção de fêmeas hiperprolíficas na suinocultura industrial, com o aumento no número de desmamados/fêmea/ano, pode gerar consequências como menor peso dos leitões ao nascimento, desuniformidade da leitegada e maior concorrência pelos tetos da fêmea. Do mesmo modo, há desequilíbrio entre o número de conceitos que sobrevivem ao período pós-implantação e a capacidade uterina. É inquestionável que a hiperprolificidade da fêmea suína trouxe inúmeros ganhos à suinocultura em termos de tamanho de leitegada, no entanto os desafios em relação ao crescimento dos leitões persistem.

O maior número de nascidos ocasiona alta demanda na produção de leite da fêmea suína para atender os seus respectivos leitões. A quantidade de nutrientes ingerida pela matriz no período de lactação afeta a produtividade da leitegada pela influência da quantidade de leite

ingerido, e reflete, conseqüentemente, no peso do leitão ao desmame, no crescimento até o abate, e ainda afeta o desempenho reprodutivo subsequente da fêmea (TOKACH et al., 1992). A fêmea suína não realiza a ingestão energética equivalente com a produção de leite necessária para os leitões, e isso resulta em produção de leite insuficiente, reduzido desempenho reprodutivo subsequente e ainda, refugagem precoce de leitões. Além disso, devido ao padrão de aleitamento dos suínos e alta competição dos leitões, é difícil para matriz cuidar dos indivíduos da prole do que o número de tetas funcionais.

Dessa forma, são necessárias alternativas para solucionar este problema. Sobre a nutrição da fêmea suína, existem diversos trabalhos com relação a suplementação de aminoácidos, como a arginina, com o objetivo de aumentar a produção de leite (MATEO et al., 2008; CHE et al., 2019; HOLANDA et al., 2019). Adicionalmente, são realizadas pesquisas na área de melhoramento genético animal para se aumentar a quantidade de tetos funcionais da matriz suína e incrementar a produção de leite (WHEELER, 2003; ANRAIN et al., 2015). Apesar desses estudos, é necessária uma ação mais rápida em relação aos leitões supranumerários pois, atualmente, esse maior número de nascidos já é realidade nas granjas de suínos.

Dentre as práticas atuais para a leitegada numerosa, tem-se o desmame precoce, que visa salvar os leitões supranumerários descendentes de fêmeas hiperprolíficas, dada a insuficiente produção de leite, indisponibilidade de tetos e alta competição entre os leitões (COLSON et al., 2006). Com o desmame precoce, é necessária a utilização de um substituto de leite para nutrição dos leitões desmamados. Com isso, existem diferentes produtos no mercado com o objetivo de atender a demanda de leitões visando o desenvolvimento dos animais.

Outro manejo empregado para leitões supranumerários são as mães de leite, que utiliza outras fêmeas para aleitar os leitões excedentes, permitindo que sejam desmamadas duas leitegadas por fêmea na mesma lactação (BRUUN et al., 2016). Porém, algumas desvantagens desse manejo, como a perda de peso da fêmea, aumento do intervalo desmame-estro, baixa taxa de ovulação e redução no número de leitões nascidos totais e vivos no parto subsequente, ocasionam uma resistência da utilização dessa prática em várias granjas comerciais de suínos (THAKER; BILKEI, 2005).

Ainda como alternativa para a produção aumentada de leitões, diversos estudos são realizados sobre o confinamento temporário e lactação coletiva. O confinamento temporário é realizado com abertura da baia em média de 5 dias, e permite maior movimentação da matriz. Já a lactação coletiva é realizada para que as fêmeas e leitegadas se misturem antes do desmame. Do ponto de vista de bem-estar animal, são práticas que despertam interesse, pois as gaiolas

atuais da maternidade limitam os movimentos da fêmea suína, aumentam o risco de ocorrência de natimortos e promovem reações agressivas da fêmea em relação à leitegada. Além disso, os sistemas de lactação coletiva apresentam efetividade, pois necessitam de menor número de equipamentos e estruturas tecnológicas para alimentar os leitões.

3.1.1 Desmame precoce e suplemento lácteo

Naturalmente, o desmame espontâneo da fêmea suína ocorre entre dez e 12 semanas de idade do leitão e pode se estender até 20 semanas de idade. Nesse período, ocorre um fim da secreção láctea e desinteresse mútuo entre a matriz e a leitegada (ABCS, 2014). No sistema intensivo de produção de suínos, ocorreu a diminuição gradativa da idade ao desmame ao longo dos anos. Na década de 1970, os produtores brasileiros realizavam o desmame aos 56 dias de idade, e no início da década de 1980, a idade foi reduzida para 49 dias. Ainda na década de 1980, a redução da idade ao desmame foi para 42 dias, e no final desta década, foi para 35 dias de idade. No início da década de 1990, a idade de desmame foi para 28 dias (ANTUNES, 2018). Atualmente, diante do objetivo de intensificação da produção de suínos, o desmame realizado nas granjas ocorre usualmente entre 21 e 28 dias de idade do leitão.

Com a maior produção de leitões, o desmame super precoce, inferior aos 21 dias de idade, é uma alternativa para solucionar o problema de maior desgaste da fêmea hiperprolífica suína, que ocorre pela maior exigência da fêmea na produção de leite, se comparada com a sua capacidade fisiológica. O desmame precoce permite maior aproveitamento da capacidade reprodutiva da matriz e melhor uso das instalações, e é responsável pelo aumento do número de leitões produzidos por matriz por ano (FERREIRA; SOUZA, 2004). Porém, o desmame precoce apresenta pontos limitantes em relação aos resultados da produção de suínos.

O desmame é considerado um dos principais estressores que os animais podem experimentar (KELLEY, 1980). De uma forma geral, provoca uma resposta imune induzida pelo desmame (KICK et al., 2012), disfunção intestinal (WIJTEN; VAN DER MEULEN; VERSTEGEN, 2011; WU et al., 2012), distúrbios endócrinos (ZHU et al., 2012), e maior estresse oxidativo do organismo dos animais (NOVAIS et al., 2021). Portanto, é necessário planejamento e cuidado com o manejo e alimentação do leitão após o desmame.

A produção de leite da matriz suína é maior em leitegadas grandes, mas foi relatado que a lactação atinge um platô durante o pico da lactação com ninhadas de 12 a 14 leitões

(AULDIST et al., 1998). Segundo a Agriness (2019), o Brasil atingiu a média de 31,02 leitões nascidos vivos/fêmea/ano. Todavia, devido ao maior número de nascidos, produção de leite insuficiente e incompatibilidade com a quantidade de tetos funcionais, em média 7 pares, é possível que haja a necessidade da prática do desmame precoce e inclusão de um substituto eficaz de leite.

Os sucedâneos de leite auxiliam na nutrição de leitões órfãos ou em situações em que a matriz não tem capacidade de atender às demandas das leitegadas (AZAIN et al., 1996). Os sucedâneos podem ser fornecidos nas baias de maternidade juntamente com a mãe, ou em ambientes específicos e controlados, denominados berçários. Porém, quanto maior o número de leitões nas baias com as mães, maior risco de aumento de morte dos animais por esmagamento (HALES et al., 2014; CHIDGEY et al., 2015). Portanto, apesar do desmame precoce em berçários prejudicar o bem-estar dos leitões, este manejo pode ser considerado o ideal para reduzir a mortalidade dos animais por esmagamento.

O substituto de leite é uma combinação de produtos de origem vegetal e animal, destinados a substituir completamente o leite. O sucedâneo ideal deve ser de boa qualidade, fácil preparo e administração, ser palatável, não sedimentar, ser pobre em fibra e rico em proteína e energia. Os substitutos de leite, se comparados com o leite natural da fêmea, apresentam como vantagem a redução das mudanças bruscas no trato digestivo, e facilidade de estocagem. Os substitutos do leite comerciais normalmente contêm leite em pó desnatado e soro de leite. Componentes vegetais também são adicionados, como amido e proteínas de trigo e soja, porém o intestino delgado dos leitões ainda não está totalmente adaptado para digerir tais componentes (PLUSKE; HAMPSON; WILLIAMS, 1997). Portanto, preparar gradativamente o intestino para substituir uma dieta de leite para ingredientes sólidos vegetais e estudar possíveis compostos do sucedâneo é importante para o período pós-desmame.

Em um estudo realizado por Madsen et al. (2018), a utilização de sucedâneo de leite, com adição de aminoácidos, como L-carnitina e L-arginina promoveu maior crescimento de leitões e melhor maturação muscular. Outros autores avaliaram o efeito de um substituto do leite com farinha de trigo no crescimento, atividade de enzimas intestinais e função imunológica de leitões em comparação com aqueles alimentados apenas com leite. Os autores concluíram que animais que receberam sucedâneo de leite com farinha de trigo sofreram alterações sugerindo adaptação a uma dieta vegetal e melhor resposta ao desmame (AMDÍ et al., 2021). Portanto, diversos estudos que buscam aperfeiçoar cada vez mais a produção de sucedâneos comerciais foram documentados na literatura.

Entretanto, o desmame precoce é acompanhado pela severa interrupção do crescimento e ocorrência de diarreia nos animais. Consequentemente, a escolha de um bom substituto do leite deve ser realizada em granjas comerciais, com atenção à formulação do sucedâneo, e não somente pelos teores dos nutrientes, mas também as fontes de proteína, carboidratos e gordura digestível do produto.

3.1.2 Mães de leite

As mães de leite são fêmeas suínas que desmamam uma leitegada adicional, depois de realizar o desmame dos seus próprios leitões. A vantagem deste sistema é a possibilidade de desmamar duas leitegadas por matriz e, consequentemente, mais leitões em um período de lactação. No entanto, é necessário conhecer as principais consequências do uso de mães de leite no desempenho reprodutivo de matrizes. De acordo com a ABCS (2014), a necessidade de um número significativo de mães de leite para o excesso de leitões impactam negativamente os dados de produtividade.

O maior período de lactação da fêmea suína como mãe de leite ocasiona maior exigência nutricional, o que representa um desafio em relação à formulação da ração da matriz. O consumo inadequado de nutrientes e de energia na lactação pode alterar a fisiologia da fêmea suína, que entra em balanço energético negativo, com maior mobilização de gordura e músculo. Segundo Thaker e Bilkei (2005), o aumento da perda de peso corporal durante a lactação influenciou negativamente o intervalo entre o desmame e o estro da matriz, aumentando os dias não produtivos na granja (DNPs), afetando negativamente a eficiência o número de partos/matriz/ano.

Ademais, maior mobilização de gordura e músculo durante a fase de lactação pode reduzir a taxa ovulatória e a qualidade dos oócitos liberados, impactando negativamente o tamanho da leitegada no parto seguinte (QUESNEL; PRUNIER, 1995; MEJIA-GUADARRAMA et al., 2002). Com isso, há um entrave na produção de suínos, pois as fêmeas foram melhoradas geneticamente para terem maior número de leitões nascidos e o manejo de mães de leite reduz a produção de leitões em partos subsequentes.

Outro fator negativo importante das mães de leite é o aparecimento de estro no momento da lactação. A prolactina apresenta ação inibitória sobre o início da atividade dos ovários no pós-parto. Porém, quando realizado o manejo de mães de leite em uma única etapa, no qual a

fêmea no 21º dia de lactação recebe uma segunda leitegada jovem, com menor exigência lactacional, ocorre redução da prolactina. Consequentemente, o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é ativado, e ocorre a manifestação do estro da fêmea, que ocasiona o aumento dos DNPs na granja. Assim, foram desenvolvidos diferentes manejos de mães de leite, realizados em duas etapas (BRUUN et al., 2016). Porém, são manejos complexos que apresentam dificuldades na rotina de granjas.

Ainda sobre o manejo de mães de leite, apesar de propor uma recuperação dos leitões supranumerários, a maior exposição das mães com os leitões aumenta o risco da contaminação com os agentes que se pretende eliminar ou controlar na maternidade. Em um estudo de 2021, leitegadas com mães de leite apresentaram maior probabilidade de serem infectados pelo vírus Influenza A quando comparadas com leitegadas que permaneceram com as mães biológicas (GARRIDO-MANTILLA et al., 2021). Portanto, muitos produtores de suínos não conseguem adaptar suas granjas para utilização desse manejo.

Uma alternativa ao uso das mães de leite é a utilização de ambientes próprios para aleitamento artificial, que usualmente são chamados de berçários. Esta instalação apresenta aquecimento de ambiente próprio para o leitão, e um sistema de distribuição de substitutos de leite em pequenos comedouros, que pode ser usado para leitões com mais de três dias de vida (ABCS, 2014).

3.1.3 Confinamento temporário e lactação coletiva

A produção de uma leitegada numerosa é uma realidade atual na suinocultura. Portanto, diferentes manejos são discutidos para contornar a problemática da insuficiência de leite e tetos funcionais da fêmea suína. O estresse da fêmea suína provocado pelo tipo de alojamento restrito desencadeia o problema da agalaxia ou hipogalaxia (MARTIN et al., 1992). Assim, uma opção para melhoria na produção de leite seria a utilização de gaiolas de forma temporária, e em seguida, baias que permitem o movimento livre da matriz após os primeiros dias de lactação, favorecendo a redução do estresse da fêmea.

Acredita-se que o confinamento temporário de fêmeas suínas em gaiolas reduz a atividade da glândula adrenal, além de melhorar a imunidade a longo prazo. Além disso, a redução do período de confinamento durante a lactação pode melhorar o bem-estar da matriz. Porém, a sobrevivência dos leitões pode ser colocada em risco uma vez que a ausência de

confinamento permite mudanças que podem aumentar os eventos de esmagamento dos leitões (MARCHANT et al., 2000; MELIŠOVÁ et al., 2014).

Um estudo de Goumon et al. (2018) evidenciou que o confinamento da fêmea suína durante o parto e até o 3º dia na lactação é suficiente para assegurar a sobrevivência, crescimento e comportamento da sua própria leitegada. Do ponto de vista do bem-estar dos leitões e da matriz, este manejo pode ser uma opção segura de alojamento dos animais na fase da maternidade. Dessa forma, a diminuição do estresse da matriz pode aumentar a produção de leite, e atender a demanda de leite pelos leitões na fase inicial da vida. Porém, essa mudança estrutural na granja deve ser avaliada financeiramente pelo produtor.

Outro manejo discutido é a lactação coletiva, também denominada de sucção ou amamentação cruzada. Esse sistema permite o movimento livre das leitegadas, que se misturam durante a fase da maternidade. De uma forma geral, esse sistema possui características construtivas que permitem expressão mais completa do comportamento natural de parto e amamentação de suínos. De acordo com Meynhardt (1980), a ingestão de leite pelo leitão de uma matriz que não seja a própria mãe, pode ocorrer em um ambiente natural.

Um aspecto importante da lactação coletiva é que a fêmea suína pode amamentar leitões não descendentes para remover o leite restante e reduzir a pressão no úbere (ROULIN, 2002). Além disso, a amamentação cruzada pode ocorrer inadvertidamente porque a fêmea suína não percebe os leitões não descendentes. Dessa forma, após a mistura de fêmeas suínas e leitões, a lactação coletiva e amamentação cruzada permite a ingestão de leite suficiente de animais excedentes de fêmeas hiperprolíficas.

Segundo Olsen, Dybkjaer e Vestergaard (1998), a sucção cruzada pode proporcionar benefícios para leitões que apresentam uma baixa ingestão de leite de sua própria mãe. Adicionalmente, a amamentação cruzada pode ocasionar maior uniformidade dos leitões quando o tamanho da leitegada é elevado. Porém, como pontos negativos, as fêmeas suínas jovens podem apresentar sofrimento com a amamentação cruzada e massagem cruzada de leitões, com maior número de lesões nos tetos (BOHNENKAMP et al., 2013). Em algumas situações, as matrizes podem ser mais agressivas com os leitões não descendentes. Ademais, a utilização comercial do sistema de lactação coletiva é limitada devido a maior exigência de espaço físico.

De uma forma geral, a amamentação cruzada exhibe estratégias diferentes em relação ao número de outras fêmeas que se misturam, e como é realizado o manejo, se de forma permanente ou não permanente. Adicionalmente, equalizar os tamanhos das leitegadas e o ajuste do número de leitões lactentes por fêmea ao número de tetos funcionais, limita a

amamentação cruzada. Além disso, efeitos variáveis da ordem de parição da fêmea suína também influencia na ocorrência de aleitamento cruzado (OLSEN; DYBKJAER; VESTERGAARD, 1998; MALETÍNSKÁ; ŠPINKA, 2001), possivelmente porque a paridade pode estar relacionada com a produção de leite ou tamanho da leitegada.

3.2 Desmame precoce e desempenho da matriz e dos leitões

Na suinocultura atual, a prática de desmame tardio é realizada por volta de 28 dias de idade, e o precoce é realizado em período inferior aos 21 dias. O desmame precoce é realizado pela melhoria do *status* sanitário dos animais nas fases subsequentes da criação devido à diminuição do contato da fêmea com seus leitões (MACHADO, 2002; DRITZ et al., 1996). Além disso, a separação da matriz e do leitão provoca uma redução do intervalo de desmame-estro (IDE) da fêmea, melhora a produtividade das matrizes, e proporciona melhor aproveitamento das instalações na granja (SOARES, 2004).

Outro fator importante para a realização do desmame precoce é que a produção de leite da matriz diminui à medida que os leitões crescem. Consequentemente, o leite passa a não atender às necessidades de desenvolvimento dos leitões, sendo necessário fornecer ração para a leitegada (SANTOS; MASCARENHAS; OLIVEIRA, 2016). Portanto, a prática de desmame precoce apresenta o intuito de nutrir os animais com um substituto de leite para compensar a redução da produção de leite, e não ocasionar o desgaste excessivo da fêmea devido à produção de leitões supranumerários.

Existem diversos fatores que influenciam o desenvolvimento dos leitões, como por exemplo a sanidade dos animais, ambiente, manejo, genética e nutrição. Sesti e Moreno (1997) afirmaram que quando ocorre diminuição da idade ao desmame, de 21 para 14 dias, há redução da mortalidade dos leitões, justamente pelo fato de se conseguir uma melhoria do status sanitário dos animais. Portanto, quando ocorre a melhora da sanidade dos animais, favorece a redução da mortalidade e de perdas significativas na produção suinícola.

Outro aspecto importante a ser considerado é sobre a produção de leite e desgaste energético da fêmea suína. O desmame precoce reduz os efeitos negativos do estresse térmico extremo na perda de tecido da matriz e subsequente potencial reprodutivo (SPENCER et al., 2003). O estresse, ocasionado pelos dias de lactação, estimula menor ingestão de ração pela matriz, perda de tecido corporal, aumento do IDE, redução do desempenho reprodutivo

subsequente, menor produção de leite e reduzido ganho de peso da leitegada (BLACK et al., 1993; RENAUDEAU; NOBLET, 2001). Portanto, apesar do desmame tardio favorecer o desempenho do leitão em algumas situações, esta prática prejudica a atividade produtiva da fêmea suína.

Após o desmame, o leitão precisa ingerir quantidade suficiente de sucedâneo e/ou ração ganhar peso de forma eficiente. Contudo, os animais precisam de dieta diária que contenha nutrientes, e adaptação à dieta para que se tenha desenvolvimento intestinal normal. Leitões que não recebem uma nutrição adequada, não ganham peso diário após o desmame em comparação com os leitões lactentes. Segundo Spencer et al. (2003), leitões desmamados precocemente aos 14 dias, alimentados com um substituto ilimitado de leite, criados em ambiente a 32 °C, atingiram pesos semelhantes aos suínos desmamados com 19 dias de idade.

Uma opção para favorecer o consumo de sucedâneo seria a utilização de máquinas de alimentação automáticas nas maternidades, junto com as mães ou em sistemas de aleitamento artificial, que apresentam a vantagem adicional de diminuição de mão-de-obra necessária, comparativamente à preparação manual. Com este sistema, os leitões têm leite disponível o dia todo. Couto (2013) demonstrou que os leitões submetidos ao sucedâneo, em cada classe de peso, apresentaram aos 165 dias de idade, pesos iguais aos leitões amamentados pela mãe. Desta forma, é possível resultados satisfatórios quanto à prática do desmame antecipado de leitões desde que se faça o correto manejo.

Em contrapartida, o desmame precoce pode ser um manejo que compromete o desempenho do leitão futuramente nas fases de criação. Segundo Armstrong e Clawson (1980), o baixo desempenho durante o período de transição do leite, fornecido de 60 a 90 minutos pela fêmea suína, para uma dieta seca fornecida *ad libitum*, provoca redução do peso corporal dos animais, baixa ingestão e diarreia, comprometendo o desenvolvimento dos animais.

O desmame precoce é um dos eventos estressantes que podem desencadear diversos fatores de estresse em suínos (MOESER et al., 2019). O leitão é exposto simultaneamente a vários estressores, incluindo separação materna e de ninhada, transporte, mudanças na hierarquia social, mudança no ambiente e na fonte de alimento. O consumo e o aproveitamento da dieta sólida estão diretamente correlacionados com a idade dos leitões e, quanto mais precoce o desmame, maiores serão os efeitos deletérios sobre a fisiologia, comportamento e estado imunológico que afetarão o desenvolvimento dos leitões (WEARY; APPLEBY; FRASER, 1999; COLSON et al., 2006; DAVIS et al., 2006). Segundo Weary, Appleby e Fraser (1999), a separação do leitão de sua mãe resulta em aumento de angústia e frustração. Apesar da

utilização de dietas especializadas que permitem a adaptação à dieta sólida e crescimento, afeta de forma significativa o desenvolvimento dos animais.

Assim, atrasos no ganho de peso durante o início de crescimento terão consequências negativas, resultando em baixos pesos ao abate ou no aumento do número de dias na fase de crescimento e terminação (VARLEY; WISEMAN, 2001). Portanto, os efeitos negativos e positivos do desmame precoce devem ser considerados, tanto a nível de leitões como de matrizes. Mesmo que os leitões apresentam pior ganho de peso nas fases subsequentes, deve ser levada em consideração a melhora na eficiência reprodutiva da matriz.

3.3 O cuidado materno nos primeiros dias de vida do animal

O sucesso da produção animal está interligado aos cuidados neonatais que podem refletir ao longo da vida do animal, como boas técnicas de manejo e atenção, que evitam doenças e promovem crescimento saudável de toda espécie animal. Após o nascimento, ocorrem várias mudanças fisiológicas nos neonatos, que representa uma adaptação para a vida extrauterina. Consequentemente, diversos cuidados após o nascimento de animais, tais como, a cura de umbigo, alimentação, desmame, instalações adequadas e vacinação também são importantes para a garantia da saúde.

Adicionalmente, o cuidado materno é extremamente importante nos primeiros dias de vida. A habilidade materna está associada à produção de leite e ao comportamento cuidadoso como emissão do som para chamar os leitões para mamar, e se deitar cuidadosamente para evitar o esmagamento de leitões. Segundo Hohenboken (1985), os efeitos maternos de interesse na produção animal são pré-natal, que ocorre no ambiente uterino, como a transferência de anticorpos maternos e leite para a prole, e o efeito materno pós-natal, como os cuidados maternos da mãe até o desmame.

A interação estabelecida entre a mãe e os leitões é realizada através do olfato, comunicação oral e contatos táteis (ANDERSSON et al., 2011; OCEPEK; ANDERSEN, 2017). A comunicação materna fortalece o reconhecimento e a atenção da prole (MAYNARD-SMITH; HARPER, 2003), e é crucial para manter os leitões próximos e protegê-los do perigo (POKORNÁ et al., 2008; MELIŠOVÁ et al., 2011). Segundo Ocepek et al. (2017), as fêmeas suínas hiperprolíficas apresentaram uma maior comunicação com seus leitões, porém essa comunicação diminuiu com o aumento da ordem de paridade.

As fêmeas suínas que interagem mais com seus leitões, durante os primeiros dois dias após o parto, apresentam menor mortalidade de leitões, independentemente da causa, seja por inanição ou esmagamento. Isso resulta em maior sobrevivência dos leitões ao desmame. A sobrevivência ocorre devido à maior consciência da fêmea pela presença do leitão e consequentemente pode protegê-lo (OCEPEK; ANDERSEN, 2018). Portanto, os cuidados maternos são de importância crucial para a sobrevivência do leitão, com menor mortalidade de leitões, e maior quantidade e peso dos leitões desmamados.

Em um estudo em camundongos, Legates (1972) demonstrou que os efeitos maternos desempenharam papel importante no crescimento inicial. Porém, essa influência diminuiu após desmame, quando a influência dos genes transmitidos para o animal tem efeito direto na taxa de crescimento. Em suínos, Robison (1972) concluiu que a interação da matriz com os leitões, e efeitos maternos exercem uma influência importante no crescimento pós-natal precoce.

Alguns estudos sugerem que a mudança drástica nas condições físicas e no ambiente social pode resultar em diminuição do sucesso dos cuidados maternos, possivelmente devido ao estresse (RUSHEN; LADEWIG; PASSILLÉ, 1995). Portanto, o estresse provocado pela alteração do manejo da amamentação cruzada e massagem cruzada de leitões (BOHNENKAMP et al., 2013), assim como agressividade aos leitões não descendentes (OLSEN; DYBKJAER; VESTERGAARD, 1998), provocariam mudanças no comportamento materno. Dessa forma, os diferentes comportamentos maternos em sistemas de amamentação coletiva podem ser afetados pelas transições em termos de ambiente físico e social dentro desses sistemas (VAN NIEUWAMERONGEN et al., 2014).

Outro fator que interfere nos cuidados maternos é o tipo de alojamento. Segundo Dybkjaer et al. (2001), a frequência de cuidados bem-sucedida é afetada pelo alojamento, sendo que matrizes que pariram em um sistema de gaiolas amamentaram com maior frequência em comparação às fêmeas em amamentações coletivas. Outro fator importante é quantidade de leitões, sendo que à medida que o tamanho da leitegada aumenta, a capacidade materna da fêmea terá que ser maior (PUTZ, 2015). Em um estudo em ratos, quanto maior a quantidade de indivíduos, menor probabilidade a prole teria de sobreviver devido à menor intensidade do cuidado materno individual (KUMARESAN; ANDERSON; TURNER, 1966). Portanto, a hiperprolificidade da fêmea suína pode interferir nos cuidados maternos, e ocasionar piora no crescimento dos leitões em fases subsequentes da criação.

3.4 Comportamento de animais desmamados precocemente

No desmame, independentemente da idade, ocorre diferentes alterações de comportamento dos animais, como por exemplo aumento de vocalizações, inquietação, comportamentos mais agressivos com os companheiros de baia, além de maior disputa da leitegada. Segundo Orgeur et al. (2001), quanto mais precoce é o desmame, mais intenso é o comportamento agressivo. Sendo assim, a separação prematura da mãe é vista como causa de angústia em muitas espécies animais, muitas vezes evidenciada por vocalização prolongada, atividade inquieta e, em alguns casos, por efeitos comportamentais a longo prazo.

Em estudos realizados em ratos e camundongos desmamados precocemente, os filhotes apresentam comportamentos emocionais semelhantes à ansiedade, depressão, além de demonstrarem maior tendência ao estresse (KANARI et al., 2005; SHIMOZURU et al., 2007; MOGI et al., 2016). Outro estudo realizado em primatas, os indivíduos separados de forma prematura de suas mães, têm sido usados como modelo para entendimento da depressão em humanos (HRDINA; HENRY, 1981).

Em contrapartida, em leitões desmamados aos 12 dias de idade, os filhotes no teste do campo aberto demonstraram uma inibição comportamental (vocalizações reduzidas e menor atividade), e essa diferença de tratamento pode ser explicada por uma habituação mais rápida ao teste em suínos desmamados aos 12 dias de idade (SUMNER et al., 2008). Testes para mensurar a ansiedade são realizados em diferentes espécies, como o teste do campo aberto, avaliando a atividade locomotora e exploratória. Existem divergências na literatura sobre o comportamento dos animais dos mamíferos, de forma geral, no desmame precoce. Dessa forma, são necessários mais estudos que possam explicar melhor sobre o tema.

Outra alteração de comportamento inerente ao desmame precoce em ratos é sobre o controle do comportamento alimentar, com retardo do início da saciedade e preferência por alimentos palatáveis (OLIVEIRA et al., 2011). Silveira et al. (2005) demonstraram que o estresse provocado pela separação materna no período de lactação, aumenta a ingestão dos alimentos que apresentam maior palatabilidade. Consequentemente, a manipulação da idade de desmame leva a mudanças a longo prazo na sequência comportamental de saciedade e na taxa de consumo alimentar.

Diversos estudos experimentais em ratos demonstram que o desmame precoce aumenta a agressividade e o comportamento de ansiedade na idade adulta (KANARI et al., 2005; KIKUSUI; TAKEUCHI; MORI, 2004; NAKAMURA et al., 2008). Essas alterações são provocadas por um aumento da atividade do eixo hipotalâmico hipofisário adrenal, com o

aumento dos níveis de glicocorticoides circulantes, em resposta a agentes estressores (LADD et al., 2000; PLOTSKY; MEANEY, 1993).

Em felinos, o desmame precoce provoca maior probabilidade de agressão a estranhos e maior probabilidade de comportamento estereotipado se comparado ao desmame tardio (AHOLA; VAPALAHTI; LOHI, 2017). Em suínos, a idade de desmame também pode aumentar o comportamento agressivo, estereotipado, que compromete a memorização de suínos desmamados com menos de três semanas de idade (SOUZA; ZANELLA, 2008).

Ainda sobre o desmame precoce e alteração comportamental em suínos, um aspecto importante é a vocalização dos leitões. A vocalização produzida no desmame aumenta em duração e intensidade quando a idade de desmame diminui (ORGEUR et al., 2001). Portanto, a intensidade e frequência de vocalizações têm sido frequentemente utilizadas como indicador de estresse ao desmame. Em leitões, além da separação da mãe e da mudança de alimentação, os filhotes têm que se adaptar aos novos integrantes no grupo na ocasião das misturas de leitegadas (WEARY; APPLEBY; FRASER, 1999).

Outro comportamento de leitões desmamados precocemente é a fricção da barriga dos companheiros de baia. Massagear as tetas da matriz é um comportamento natural de leitões em lactação, porém, é anormal direcionar esse mesmo comportamento à barriga dos companheiros de leitegada (SPINKA, 2006). Isso ocorre por causa da necessidade de sucção do animal. Assim, devido à ausência da mãe, esse ato acaba sendo redirecionado aos companheiros de baia.

Com relação ao comportamento dos animais lactentes sabe-se que a neurogênese do hipocampo pode explicar algumas diferenças encontradas. A neurogênese do hipocampo é regulada por experiências, hormônios e condições ambientais, sendo que neurogênese hipocampal é irreversível de desregulações ocorridas no início da vida. Portanto, o estresse provocado pela separação dos leitões da mãe pode provocar alterações cognitivas e de memorização, sendo que o hipocampo é responsável por essas respostas. Em estudo realizado por Korosi et al., (2012), os autores afirmaram que eventos estressantes no início da vida são causadores de alterações permanentes no sistema neuroendócrino e cognitivo e afetam a capacidade de aprendizado e de memorização. Portanto, o estresse precoce de leitões atenuaria a formação de memórias e diminuiria as respostas do hipocampo aos eventos ameaçadores.

3.5 Efeitos do desmame precoce e descuido materno sobre perfis epigenéticos e de expressão gênica

Mecanismos epigenéticos produzem alterações fenotípicas herdáveis sem alterar a sequência do DNA, e permitem a adaptação dos organismos em diferentes condições ambientais. Esta adaptação é possível devido a mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, modificação de histonas e micro RNA (miRNA), que controlam a expressão gênica (BERNAL; JIRTLE., 2010). Desta forma, a epigenética avalia o padrão da expressão gênica, conferido por uma série de mecanismos anteriormente citados, promovendo a remodelação da cromatina.

O epigenoma que engloba os processos epigenéticos é dinâmico durante toda a vida e está associado à interação entre atividades genéticas e o ambiente (BERNSTEIN; MEISSNER; LANDER, 2007; MONK et al., 2019). Na epigenética, existe um campo de estudo que analisa o comportamento animal, que é dependente da experiência social, dieta, nutrição, exposição a toxinas etc.

Diferentes experiências que ocorrem durante o período de desenvolvimento em mamíferos, como na vida perinatal, podem influenciar negativamente o comportamento e as funções fisiológicas, incluindo o crescimento, o metabolismo, a reprodução e as respostas imunes. Assim, ambientes estressantes no início da vida podem induzir consequências permanentes em animais (KENDLER et al., 2002; MORGAN et al., 2007). Diversas formas de cuidados maternos, e até mesmo a ausência deste, tem sido relacionados com alterações na expressão gênica por meio de mecanismos epigenéticos. Exemplos de eventos como a negligência (IVY et al., 2008) e abuso materno (RAINEKI; MORICEAU; SULLIVAN, 2010), separações repetidas (PLOTSKY; MEANEY, 1993) e privação de cuidados maternos (ELLENBROEK; KROONENBERG; COOLS, 1998), resultam em alterações imediatas e/ou de longo prazo do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA).

A maioria dos estudos sobre os ambientes adversos durante a vida neonatal, que desempenham um papel crítico na regulação neurobiológica do comportamento foram realizados em modelos experimentais com roedores e primatas. Estes trabalhos comprovaram que ocorre uma cascata de eventos centrais e periféricos, resultando na liberação de corticosteroides pelas glândulas adrenais. Um exemplo é a ligação dos glicocorticoides aos receptores no hipocampo, que provoca uma inibição do fator de liberação de corticotrofina (CRF) pelo hipotálamo (KAPPELER; MEANEY, 2010). De uma forma geral, a capacidade de resposta do eixo HPA pode ser deteriorada pela interrupção das interações habituais entre a mãe e o filhote, o que pode induzir alterações persistentes na neurobiologia, fisiologia e

comportamento emocional em animais adultos (ELLENBROEK; KROONENBERG; COOLS, 1998; LYONS et al., 1998; PRYCE et al., 2005; ENTHOVEN et al., 2008; NISHI et al., 2013).

As alterações comportamentais e neuroendócrinas podem persistir ao longo da vida. As alterações epigenéticas associadas também são encontradas no sistema nervoso central, indicando que a presença materna durante o período neonatal tem efeitos significativos sobre o desenvolvimento de redes neurais (WEAVER et al., 2004). Diferentes tecidos são analisados nas alterações epigenéticas em animais para avaliar o comportamento, como hipocampo, hipotálamo e amígdala (VICENTIC et al., 2006).

O hipocampo está relacionado a processos cognitivos como aprendizado e memória, mas também está envolvido com a resposta ao estresse, com efeitos inibitórios no eixo HPA. Ademais, a comunicação amígdala-hipocampo seria importante para a recordações e a expressão de memórias relacionadas ao medo (SEINDENBECHER et al., 2003). Segundo Tenorio-Lopes et al. (2017) e Fabianová et al. (2018), evidências mostraram que a ausência materna estimula várias regiões do cérebro de formas diferentes, dependendo do tempo e duração dessa separação entre mãe e o filhote.

Em estudos realizados em ratos, Liu et al. (1997) e Francis et al. (1999) encontraram que os adultos, filhos de mães que exibem níveis satisfatórios de cuidado durante a primeira semana de vida, apresentaram maior expressão do receptor de glicocorticoide (GR) do hipocampo, aumentando a sensibilidade de glicocorticoides no *feedback* negativo, e diminuindo a expressão de CRF e mais respostas de estresse no eixo HPA. Portanto, a diminuição de cuidados parentais aumenta a magnitude das respostas emocionais, autonômicas e do eixo HPA ao estresse na idade adulta.

Alterações do cuidado materno produzem alterações estáveis de metilação do DNA e na estrutura da cromatina, fornecendo um mecanismo para os efeitos de longo prazo de cuidado materno na expressão gênica na prole (MEANEY, 2001). O envolvimento da metilação do DNA com consequente silenciamento de genes é conhecido uma vez que a metilação da região promotora do gene leva a um impedimento de ligação do promotor ao sítio, impedindo assim a transcrição gênica.

O gene *NR3C1* é responsável por codificar os receptores de glicocorticoides (GR). Segundo Weaver et al. (2004), o baixo cuidado materno em ratos resultou em um aumento da metilação no local de ligação da proteína induzida pelo fator de crescimento do nervo I (NGFI-A), localizado no gene do GR do hipocampo (*NR3C1*), levando à diminuição da expressão de *NR3C1*. Portanto, a diminuição do número de GR resulta em uma menor eficiência do *feedback* negativo do hipocampo mediado por glicocorticoides no eixo HPA.

Em outro estudo, Toki et al. (2007) evidenciaram que os ratos adultos com cuidados maternos ao longo da primeira semana de vida demonstraram um aumento da expressão de GR no hipocampo, e respostas do eixo HPA mais controladas ao estresse. É relatado por esses autores que o cuidado materno altera a expressão do GR do hipocampo na prole adulta através de mecanismos epigenéticos. Adicionalmente, outros pesquisadores relataram que o manuseio pós-natal aumenta a expressão do fator de transcrição NGFI-A e GR no hipocampo em mamíferos (MEANEY et al., 2000; LAPLANTE; DIORIO; MEANEY, 2002).

Ainda sobre as alterações moleculares, o aumento da frequência de cuidados maternos em ratos filhotes, aumenta a transcrição do gene de GR na prole, através de um aumento dependente do hormônio tireoidiano e atividade de receptores de serotonina (5-HT), com ativação da adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) e proteína quinase A dependente de cAMP (PKA) (MITCHELL; INY; MEANEY, 1990; WEAVER et al., 2007). A serotonina é um importante regulador da emoção e processos do controle comportamental e induz a desmetilação do promotor do exon 1(7) e aumenta a expressão de GR em neurônios do hipocampo, e ambos os efeitos são bloqueados por um antisense de NGFI-A *in vitro*, um RNA de fita simples que é complementar a um RNA mensageiro codificador de proteína com o qual hibridiza e, assim, impede sua tradução em proteínas (WEAVER et al., 2007). Portanto, o antisense de NGFI-A bloqueia o efeito da serotonina. Resumidamente, a redução da serotonina regulada por diversas vias pelos níveis de glicocorticoides, como via de expressão do NGFI-A e GR, é demonstrada em animais que tiveram privação materna.

Acredita-se então, que a expressão da proteína NGFI-A é alterada nos animais que recebem maior quantidade de cuidados maternos, e envolve mecanismos de liberação de serotonina. Este neurotransmissor induz um aumento de NGFI-A e consequentemente na transcrição de GR em neurônios do hipocampo de ratos (HELLSTROM et al., 2012), sendo que a expressão do gene codificador dos receptores serotoninérgicos (*HTR1A*) é menor em macacos sensíveis ao estresse (BETHEA et al., 2005). Portanto, o comportamento materno tem capacidade de alterar e regular respostas do estresse da prole.

A expressão de alguns genes específicos é responsável pela regulação do estresse, como o gene *NR3C1*, citado anteriormente. Este gene é responsável por codificar os GR, e o gene codificador de receptores de mineralocorticoides (*NR3C2*), expresso predominantemente em áreas límbicas (hipocampo, amígdala e córtex pré-frontal). Este último é co-expresso com GR e está relacionado com a neurogênese e diferenciação dos neurônios no hipocampo (HARRIS et al., 2013). Os genes *NR3C1* e *NR3C2* apresentam estruturas semelhantes e ações coordenadas

de GR e receptores de mineralocorticoides (MR) no hipocampo, que influenciam nos comportamentos emocionais e cognitivos.

O gene *FKBP5* (Prolil Isomerase 5-gene codificador da proteína FKBP51) também é um importante regulador da resposta ao estresse, e realiza a ligação de GR a glicocorticoides. A intensidade da atividade de glicocorticoides na transcrição dessa proteína é moderada por mecanismos genéticos e epigenéticos (MATOSIN; HALLDORSDDOTTIR; BINDER, 2018). Portanto, o gene *FKBP5* está envolvido com a sensibilidade dos GR ao cortisol. O gene do fator neurotrófico derivado do cérebro (*BDNF*) participa da plasticidade cerebral envolvendo mecanismos como aprendizado e memória. Os glicocorticoides podem atenuar a expressão de *BDNF*, reduzindo a neurogênese e plasticidade do sistema nervoso (HASHIMOTO, 2007). De uma forma geral, a separação e descuido materno podem promover alterações na expressão de diferentes genes, como os supracitados.

3.6 Bem-estar animal

As estratégias de manejo utilizadas para a criação de leitões supranumerários, como desmame precoce e utilização de sucedâneo de leite, foram associadas à redução do bem-estar de leitões e fêmeas suínas. Segundo Weary, Appleby e Fraser (1999), o desmame precoce dos animais, mesmo com índices satisfatórios de crescimento, pode ocasionar maior risco à saúde dos leitões gerado pelo prejuízo ao bem-estar consequente à separação precoce da mãe e ao estresse pós-desmame. As alterações comportamentais dos leitões após o desmame podem ser interpretadas como indicativos de sofrimento ou prejuízo ao bem-estar.

O desmame precoce realizado aos sete dias de idade pode reduzir o desempenho produtivo e resultar no desenvolvimento de alterações anormais de padrões de comportamento, denominados estereotípias (CARROLL; VEUM; MATTERI, 1998). Dessa forma, esses comportamentos anormais são importantes na suinocultura por indicar problemas relacionados ao bem-estar animal.

O manejo do desmame precoce está associado a problemas de bem-estar animal, pois são observados comportamentos como o aumento da vocalização, das brigas e de caminhadas pela baia (NAKAMURA et al., 2008). Além disso, ocorre o aumento da incidência de doenças, comprometimento do crescimento e aumento da mortalidade. A gravidade da redução do bem-

estar animal é associada com a idade ao desmame, sendo que animais desmamados muito cedo, sofrem mais (MAPA, 2018).

A produção supranumerária de leitões é realidade nas granjas de suínos. Ainda que o desmame precoce seja realizado por diversas granjas comerciais é necessária uma visão crítica sobre este manejo. De acordo com a Instrução Normativa número 113 (IN 113), a granja deverá dispor de orientação técnica para minimizar o estresse de leitões e matrizes no período do desmame, realizar novos projetos ou ampliar a granja para o desmame de leitões com 24 dias. As granjas com realização diferentes de 24 dias, necessitarão de adequação para que o desmame ocorra com 24 dias de idade ou mais. O prazo para adequação é até 1º de janeiro de 2045. Só será permitido o desmame precoce em casos de erradicação de doenças, conforme recomendação do médico veterinário responsável (BRASIL, 2020).

O sistema intensivo de produção de suínos no Brasil deverá se preocupar com o bem-estar animal, não por causa de uma concepção amadurecida da sociedade, mas para atender os requisitos do mercado importador de carne suína do país. Contudo, é importante analisar os efeitos do desmame precoce, e conhecer possíveis as alterações advindas desse manejo, como as questões comportamentais, fisiológicas, endócrinas e produtivas envolvidas.

REFERÊNCIAS

ABCS. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS. **Produção de suínos: teoria e prática**. 1. ed. Brasília, DF, 2014. Disponível em: https://abcs.org.br/wp-content/uploads/2020/06/01_Livro_producao_bloq_reduce.pdf. Acesso em: 21 set. 2022.

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual de 2022**. Disponível em: <https://abpa-br.org/mercados/#relatorios>. Acesso em: 15 set. 2022.

AGRINESS. **Melhores da suinocultura. 12ª Edição**. Florianópolis: 2019. Disponível em: <https://melhores.agriness.com/dados/edições>. Acesso em: 21 out. 2022.

AHOLA, M. K.; VAPALAHTI, K.; LOHI, H. Early weaning increases aggression and stereotypic behaviour in cats. **Scientific reports**, London, v. 4, n. 7, 10412. doi:10.1038/s41598-017-11173-5, sep. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11173-5>

AMDI, C. et al. Pre-weaning adaptation responses in piglets fed milk replacer with gradually increasing amounts of wheat. **The British journal of nutrition**, Cambridge, v. 126, n. 3, p. 375-382, aug. 2021. <https://doi.org/10.1017/S0007114520004225>

ANDERSSON, A. et al. Behaviour of European wild boar (*Sus scrofa*) in connection with farrowing in an enclosure. **Mammalian Biology**, Jena, v. 76, n. 3, p. 332-338, may. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2011.01.010>

ANRAIN, M. et al. Parâmetros genéticos para características de prolificidade nas raças Landrace e Large White. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 67, n. 3, p. 846-854, may.jun. 2015. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-6596>

ANTUNES, R. C. **O ensino da produção industrial de suínos - uma versão crítica**. 1a ed. Uberlândia, MG: Edibrás, p. 29-60, 2018.

ARMSTRONG, M. D.; CLAWSON, A. J. Nutrition and management of early weaned pigs: effect of increase nutrient concentration and (or) supplemental liquid feeding. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 50, n. 3, p. 377-384, mar. 1980. <https://doi.org/10.2527/jas1980.503377x>

AULDIST, D. E. et al. The influence of litter size on milk production of sows. **Animal Science**, Cambridge, v. 67, n. 2, p. 333-337, 1998. <https://doi.org/10.1017/S1357729800010109>

AZAIN, M. J. et al. Effect of supplemental pig milk replacer on litter performance: seasonal variation in response. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 9, p. 2195-2202, sep. 1996. <https://doi.org/10.2527/1996.7492195x>

BERNAL, A. J.; JIRTLE, R. L. Epigenomic disruption: The effects of early developmental exposures. **Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology**, Hoboken, v. 88, n. 10, p. 938-944, oct. 2010. <https://doi.org/10.1002/bdra.20685>

BERNSTEIN, B. E.; MEISSNER, A.; LANDER, E. S. The mammalian epigenome. **Cell**, Cambridge, v. 128, n. 4, p. 669-681, feb. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.033>

BETHEA, C. L. et al. Sensitivity to stress-induced reproductive dysfunction linked to activity of the serotonin system. **Fertility and sterility**, New York, v. 83, n. 1, p. 148-155, jan. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.06.051>

BLACK, J. L. et al. Lactation in the sow during heat stress. **Livestock Production Science**, Villaviciosa, v. 35, n. 1-2, p. 153-170, may. 1993. [https://doi.org/10.1016/03016226\(93\)90188-N](https://doi.org/10.1016/03016226(93)90188-N)

BOHNENKAMP, A. L. et al. Comparison of growth performance and agonistic interaction in weaned piglets of different weight classes from farrowing systems with group or single housing. **Animal**, Cambridge, v. 7, n. 2, p. 309-315, feb. 2013. <https://doi.org/10.1017/S1751731112001541>

BOHNENKAMP, A. L. et al. Group housing with electronically controlled crates for lactating sows. Effect on farrowing, suckling and activity behavior of sows and piglets. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 145, n. 1-2, p. 37-43, apr. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2013.01.015>

BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Instrução Normativa nº 113, de 16 de dezembro de 2020. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 16 dez. 2020. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-113-de-16-de-dezembro-de-2020-294915279>. Acesso em: 20 nov. 2022.

BRUUN, T. S. et al. Reproductive performance of “nurse sows” in Danish piggeries. **Theriogenology**, New York. v. 86, n. 4, p. 981-987, sep. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.023>

CARROLL, J. A.; VEUM, T. L.; MATTERI, R. L. Endocrine responses to weaning and changes in post-weaning diet in the young pig. **Domestic animal endocrinology**, Stoneham, v. 15, n. 3, p. 183-198, may. 1998. [https://doi.org/10.1016/s0739-7240\(98\)00006-x](https://doi.org/10.1016/s0739-7240(98)00006-x)

CHE, D. et al. Effects of Dietary L-arginine Supplementation from Conception to Post-Weaning in Piglets. **Current protein and peptide science**, Hilversum, v. 20, n. 7, p. 736-749, 2019. <https://doi.org/10.2174/1389203720666190125104959>

CHIDGEY, K. L. et al. Sow and piglet productivity and sow reproductive performance in farrowing pens with temporary crating or farrowing crates on a commercial New Zealand pig farm. **Livestock Science**, Villaviciosa, v. 173, 87-94, mar. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.01.003>

CHRISTENSON, R. K. et al. Uterine function in Meishan pigs. **Journal of reproduction and fertility**. Supplement, Oxford, v. 48, p. 279-289, 1993.

COLSON, V. et al. Consequences of weaning piglets at 21 and 28 days on growth, behaviour and hormonal responses. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 98, n. 1-2, p. 70-88, jun. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2005.08.014>

COUTO, L. F. N. **Efeito do método de aleitamento nas performances zootécnicas de suínos**, p. 73. Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal, 2013.

DAVIS, M. E. et al. Effect of weaning age and commingling after the nursery phase of pigs in a wean- to- finish facility on growth, and humoral and behavioural indicators of well-being. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 3, p.743-756, mar. 2006. <https://doi.org/10.2527/2006.843743x>

DRITZ, S. S. et al. Influence of weaning age and nursery diet complexity on growth performance and carcass characteristics and composition of high-health status pigs from weaning to 109 kilograms. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 12, p. 2975-2984, dec. 1996. <https://doi.org/10.2527/1996.74122975x>

DYBKJAER, L. et al. Effects of farrowing conditions on behaviour in multi-suckling pens for pigs. **Acta Agriculturae Scandinavica – Section A: Animal Science**, v. 51, p. 134-141, 2001. <https://doi.org/10.1080/090647001750193477>

ELLENBROEK, B. A.; KROONENBERG, P. T. V. D.; COOLS, A. R. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. **Schizophrenia research**,

Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 251-260, apr. 1998. [https://doi.org/10.1016/s0920-9964\(97\)00149-7](https://doi.org/10.1016/s0920-9964(97)00149-7)

ENTHOVEN, L. et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of newborn mice rapidly desensitizes to repeated maternal absence but becomes highly responsive to novelty. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 149, n. 12, p. 6366-6377, dec. 2008. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0238>

FABIANOVÁ, K. et al. Analysis of Fos expression in the rat olfactory neurogenic region following single exposure to maternal separation during different neonatal stages. **General Physiology and Biophysics**, Bratislava, v. 37, n. 3, p. 275-283, may. 2018. https://doi.org/10.4149/gpb_2017056

FERREIRA, R. A.; SOUSA, R.V. **O desenvolvimento do sistema imune de leitões e suas correlações com as práticas de manejo**. 2004. Boletim técnico. Disponível em: <<http://livraria.editora.ufla.br/upload/boletim/tecnico/boletim-tecnico-46.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2022.

FRANCIS, D. et al. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. **Science**, Washington, v. 286, n. 5442, p. 1155-1158, nov. 1999. <https://doi.org/10.1126/science.286.5442.1155>

GARRIDO-MANTILLA, J. et al. Impact of nurse sows on influenza A virus transmission in pigs under field conditions. **Preventive veterinary medicine**, Amsterdam, v. 188: 105257. doi: 10.1016/j.prevetmed, mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105257>

GOUMON, S. et al. Sow stress levels and behavior and piglet performances in farrowing crates and farrowing pens with temporary crating. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 96, n. 11, p. 4571-4578, nov. 2018. <https://doi.org/10.1093/jas/sky324>

HALES, J. et al. Higher preweaning mortality in free farrowing pens compared with farrowing crates in three commercial pig farms. **Animal**, Cambridge, v. 8, n. 1, p. 113-120, jan. 2014. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001869>

HARRIS, A. P. et al. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor balance in control of HPA axis and behaviour. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 648-658, may. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.08.007>

HASHIMOTO, K. *BDNF* variant linked to anxiety-related behaviors. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, Cambridge, v. 29, n. 2, p. 116-119, feb. 2007. <https://doi.org/10.1002/bies.20534>

HELLSTROM, I. C. et al. Maternal licking regulates hippocampal glucocorticoid receptor transcription through a thyroid hormone-serotonin-NGFI-A signalling cascade. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, London, v. 367, n. 1601, p. 2495-2510, sep. 2012. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0223>

HOHENBOKEN, W. D. **Maternal Effects**. In: GENERAL and quantitative genetics. Amsterdam: Elsevier Science, 1985. p. 135-149.

HOLANDA D, M. et al. Dietary L-arginine supplementation increased mammary gland vascularity of lactating sows. **Animal**, Cambridge, v. 13, n. 4, p. 790-798, apr. 2019. <https://doi.org/10.1017/S1751731118002069>

HRDINA, P. D.; HENRY, M. E. **Experimental models of mental illness: separation-induced depression in primates**. In: Hrdina, P.R., Singhal, R. Eds., Neuroendocrine Regulation and Altered Behaviour. Croom Ć. Helm, London, p. 265-275, 1981. <http://livraria.editora.ufla.br/upload/boletim/tecnico/boletim-tecnico-46.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2022.

IVY, A. S. et al. Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: A clinically relevant model for early-life stress. **Neuroscience**, Oxford, v. 154, n. 3, p. 1132-1142, jun. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.019>

KANARI, K. et al. Multidimensional structure of anxiety-related behavior in earlyweaned rats. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 156, n. 1, p. 45-52, jan. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.05.008>

KAPPELER, L.; MEANEY, M. J. Epigenetics and parental effects. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, Cambridge, v. 32, n. 9, p. 818-827, sep. 2010. <https://doi.org/10.1002/bies.201000015>

KELLEY, K. W. Stress and immune function: A bibliographic review. **Annals of veterinary research**, Paris, v. 11, n. 4, p. 445–478, 1980.

KENDLER, K. S. et al. Childhood parental loss and risk for first-onset of major depression and alcohol dependence: the time-decay of risk and sex differences. **Psychological medicine**, London, v. 32, n. 7, p. 1187-1194, oct. 2002. <https://doi.org/10.1017/s0033291702006219>

KICK, A. R. et al. Effects of stress associated with weaning on the adaptive immune system in pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 2, p. 649-656, feb. 2012. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3470>

KIKUSUI, T.; TAKEUCHI, Y.; MORI, Y. Early weaning induces anxiety and aggression in adult mice. **Physiology and behavior**, New York, v. 81, n. 1, p. 37-42, mar. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2003.12.016>

KOROSI, A. et al. Early-life stress mediated modulation of adult neurogenesis and behavior. **Behavioural brain research**, Amsterdam, v. 227, n. 2, p. 400-409, feb. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.037>

KUMARESAN, P., ANDERSON, R. R., TURNER, C. W. Effect of litter size upon milk yield and litter weight gains in rats. **Revue de tuberculose et de pneumologie**, Paris, v. 30, n. 12, p. 41-45, dec. 1966. <https://doi.org/10.3181/00379727-126-32363>

LADD, C.O. et al. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. **Progress in brain research**, Amsterdam, v. 122, p. 81-103, doi: 10.1016/s0079-6123(08)62132-9, 2000. [https://doi.org/10.1016/s0079-6123\(08\)62132-9](https://doi.org/10.1016/s0079-6123(08)62132-9)

LAPLANTE, P., DIORIO, J., MEANEY, M. J. Serotonin regulates hippocampal glucocorticoid receptor expression via a 5-HT₇ receptor. **Brain research. Developmental brain research**, Amsterdam, v. 139, n. 2, p. 199-203, dec. 2002. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(02\)00550-3](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(02)00550-3)

LEGATES, J. E. The role of maternal effects in animal breeding. IV. Maternal effects in laboratory species. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 35, n. 6, p. 1294-1302, dec. 1972. <https://doi.org/10.2527/jas1972.3561294x>

LIU, D. et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, Washington, v. 277, n. 5332, p. 1659-1662, sep. 1997. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1659>

LYONS, D. M. et al. Postnatal foraging demands alter adrenocortical activity and psychosocial development. **Developmental psychobiology**, New York, v. 32, n. 4, p. 285-291, may. 1998. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2302\(199805\)32:4<285::aid-dev3>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2302(199805)32:4<285::aid-dev3>3.0.co;2-j)

MACHADO, G. S. Desmame precoce: qual será o limite? In: Suínos & Cia – **Revista Especializada em Reprodução Suína**, n. 1 p. 12-16, 2002.

MADSEN, J. G. et al. Milk replacers supplemented with either L-arginine or L-carnitine potentially improve muscle maturation of early reared low birth weight piglets from hyperprolific sows. **Animal: an international journal of animal bioscience**, Cambridge, v. 12, n. 1, p. 43-53, jan. 2018. <https://doi.org/10.1017/S175173111700132X>

MALETÍNSKÁ, J.; ŠPINKA, M. Cross-suckling and nursing synchronisation in group housed lactating sows. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 75, n. 1, p. 17-32, dec. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(01\)00178-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(01)00178-2)

MARCHANT, J. N. et al. Timing and causes of piglet mortality in alternative and conventional farrowing systems. **The Veterinary record**, London, v. 147, n. 8, p. 209-214, aug. 2000. <https://doi.org/10.1136/vr.147.8.209>

MARTIN, C. E. et al. **Mastitis, metritis, agalactia in swine**, Colorado State University Cooperative Extension, Livestockseries – Health, n. 8.011, 1992. Disponível em: https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/205331/469_31951D019274910.pdf?sequence=1. Acesso em: 15 out. 2022.

MATEO, R. D. et al. Effects of dietary arginine supplementation during gestation and lactation on the performance of lactating primiparous sows and nursing piglets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 827-835, apr. 2008. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0371>

MATOSIN, N.; HALLDORSDOTTIR, T.; BINDER, E. B. Understanding the Molecular Mechanisms Underpinning Gene by Environment Interactions in Psychiatric Disorders: The NR3C2 Model. **Biological Psychiatry**, New York, v. 83, n. 10, p. 821-830, may. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.01.021>

MAYNARD SMITH J.; HARPER, D. **Animal signals**. Oxford Series on Ecology and

Evolution, Oxford University Press, Oxford, United States, 2003.

MEANEY, M. J. et al. Postnatal handling increases the expression of cAMP-inducible transcription factors in the rat hippocampus: the effects of thyroid hormones and serotonin. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, Washington, v. 20, n. 10, p. 3926-3935, may. 2000. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-10-03926.2000>

MEANEY, M. J. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. **Annual review of neuroscience**, Palo Alto, v. 24, p. 1161-1192, 2001. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1161>

MEJIA-GUADARRAMA C.A. et al. Protein (lysine) restriction in primiparous lactating sows: Effects on metabolic state, somatotrophic axis, and reproductive performance after weaning. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 12, p. 3286-3300, dec. 2002. <https://doi.org/10.2527/2002.80123286x>

MELIŠOVÁ, M. et al. Can sow pre-lying communication or good piglet condition prevent piglets from getting crushed? **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 134, n. 3, p. 121-129, nov. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.06.015>

MELIŠOVA, M. et al. Sow postural changes, responsiveness to piglet screams, and their impact on piglet mortality in pens and crates. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 7, p. 3064-3072, jul. 2014. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7340>

MEYNHARDT, H. **Schwarzwild-Report: Vier Jahre unter Wildschweinen**. Verlag J. Neumann-Neudamm, Berlin, Germany, 1980.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Maternidade suína – boas práticas para o bem-estar na suinocultura**. 1ª edição. Brasília: AECS, 2018, 48p.

MITCHELL, J. B.; INY, L. J.; MEANEY, M. J. The role of serotonin in the development and environmental regulation of hippocampal type II corticosteroid receptors in the rat. **Brain research. Developmental brain research**, Amsterdam, v. 55, n. 2, p. 231-235, sep. 1990. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90204-c](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90204-c)

MOESER, A. J. et al. 115 Negative impacts of early weaning on lifelong gut health in the pig. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 63-64, jul. 2019. <https://doi.org/10.1093/jas/skz122.117>

MOGI, K. et al. Early weaning impairs fear extinction and decreases brain-derived neurotrophic factor expression in the prefrontal cortex of adult male C57BL/6 mice. **Developmental Psychobiology**, New York v. 58, n. 8, p. 1034-1042, dec. 2016. <https://doi.org/10.1002/dev.21437>

MONK, D. et al. Genomic imprinting disorders: lessons on how genome, epigenome and environment interact. **Nature reviews. Genetics**, London, v. 20, n. 4, p. 235-248, apr. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0092-0>

MORGAN, C. et al. Parental separation, loss and psychosis in different ethnic groups: a case-control study. **Psychological medicine**, London, v. 37, n. 4, p. 495-503, apr. 2007. <https://doi.org/10.1017/S0033291706009330>

NAKAMURA, K. et al. Changes in social instigation and food restriction-induced aggressive behaviors and hippocampal 5HT1B mRNA receptor expression in male mice from early weaning. **Behavioural brain research**, Amsterdam, v. 187, n. 2, p. 442-448, mar. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.10.002>

NISHI, M. et al. Effects of early life stress on brain activity: implications from maternal separation model in rodents. **General and comparative endocrinology**, New York, v. 181, p. 306-309, jan. 2013. <https://doi.org/10.3390/ijms21197212>

NOVAIS, A. K. et al. Weaning differentially affects mitochondrial function, oxidative stress, inflammation and apoptosis in normal and low birth weight piglets. **Plos one**, San Francisco, v. 16, n. 2, e0247188. doi: 10.1371/journal.pone.0247188, feb. 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247188>

OCEPEK, M. et al. Can we improve maternal care in sows? Maternal behavioral traits important for piglet survival in loose-housed sow herds. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 95, n. 11, p. 4708-4717, nov. 2017. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1725>

OCEPEK, M.; ANDERSEN, I. L. Sow communication with piglets while being active is a good predictor of maternal skills, piglet survival and litter quality in three different breeds of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*). **Plos one**, San Francisco, v. 13, n. 11: e0206128, nov. 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206128>

OCEPEK, M.; ANDERSEN, I. L. What makes a good mother? Maternal behavioural traits important for piglet survival. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 193, p. 29-36, aug. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.03.010>

OLIVEIRA, S. et al. Effects of early weaning on the circadian rhythm and behavioral satiety sequence in rats. **Behavioural Processes**, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 119-124, jan. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2010.10.001>

OLSEN, A. N. W.; DYBKJAER, L.; VESTERGAARD, K. S. Cross-suckling and associated behaviour in piglets and sows. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 13-24, dec. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(98\)00182-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(98)00182-8)

ORGEUR, P. et al. Behavioural, growth and immune consequences of early weaning in one-week-old Large-White piglets. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 41, n. 4, p. 321-332, jul. aug. 2001. <https://doi.org/10.1051/rnd:2001134>

PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. **Brain research. Molecular brain research**, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 195-200, may. 1993. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(93\)90189-v](https://doi.org/10.1016/0169-328x(93)90189-v)

PLUSKE, J. R.; HAMPSON, D. J.; WILLIAMS, I. H. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. **Livestock Production Science**,

Villaviciosa, v. 51, n. 1-3, p. 215-236, nov. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(97\)00057-2](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(97)00057-2)

POKORNÁ, Z. et al. Carefulness and flexibility of lying down behaviour in sows during 24h post-partum in relation to piglet position. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 114, n. 3, p. 346-358, dec. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.04.011>

PRYCE, C. R. et al. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: potential animal models in depression research. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, New York, v. 29, n. 4-5, p. 649-674, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.03.011>

PUTZ, A. M. et al. Variance component estimates for alternative litter size traits in swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 93, n. 11, p. 5153-5163, nov. 2015. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9416>

QUESNEL, H.; PRUNIER, A. 1995. Endocrine bases of lactational anoestrus in the sow. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 35, n. 4, p. 395-414, 1995. <https://doi.org/10.1051/rnd:19950405>

RAINEKI, C.; MORICEAU, S.; SULLIVAN, R. M. Developing a Neurobehavioral Animal Model of Infant Attachment to an Abusive Caregiver. **Biological Psychiatry**, New York, v. 67, n. 12, p. 1137-1145, jun. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.12.019>

RENAUDEAU, D.; NOBLET, J. Effects of exposure to high ambient temperature and dietary protein level on sow milk production and performance of piglets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 6, p. 1540-1548, jun. 2001. <https://doi.org/10.2527/2001.7961540x>

ROBISON, O. W. The role of maternal effects in animal breeding. V. Maternal effects in swine. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 35, n. 6, p. 1303-1315, dec. 1972. <https://doi.org/10.2527/jas1972.3561303x>

ROULIN, A. Why do lactating females nurse alien offspring? A review of hypotheses and empirical evidence. **Animal Behaviour**, London, v. 63, n. 2, p. 201-208, feb. 2002. <https://doi.org/10.1006/anbe.2001.1895>

RUSHEN, J.; LADEWIG, J.; PASSILLÉ, A. M. B. A novel environment inhibits milk ejection in the pig but not through HPA activity. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 45, n. 1-2, p. 53-61, oct. 1995. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(95\)00584-F](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00584-F)

SANTOS, L. D. S.; MASCARENHAS, A. G.; OLIVEIRA, H. F. Fisiologia digestiva e nutrição pós desmame em leitões. **Revista eletrônica Nutri-Time**, v. 13, n. 1, jan.fev. 2016.

SEINDENBECHER, T. et al. Amygdalar and hippocampal theta rhythm synchronization during fear memory retrieval. **Science**, New York, v. 301, n. 5634, p. 846-850, aug. 2003. <https://doi.org/10.1126/science.1085818>

SESTI, L.; MORENO, A. M. Fisiologia reprodutiva da fêmea suína em sistemas de produção com desmame precoce segregado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS

ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 7, 1997, Foz do Iguaçu, PR. **Anais...** Foz do Iguaçu: ABRAVES, p. 32-40, 1997.

SHIMOZURU, M. et al. Early weaning decreases play-fighting behavior during the postweaning developmental period of wistar rats. **Developmental Psychobiology**, New York, v. 49, n. 4, p. 343–350, may. 2007. <https://doi.org/10.1002/dev.20202>

SILVEIRA, P. P. et al. The effect of neonatal handling on adult feeding behavior is not an anxiety-like behavior. **International journal of developmental neuroscience**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 93-99, feb. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.07.018>

SOARES, T. G.; **Efeito da desmama com 12, 15 e 18 dias de idade sobre o desempenho dos leitões**. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, pós-graduação; Medicina Veterinária. Minas Gerais/Viçosa, 2004.

SOUZA, A. S.; ZANELLA, A. J. Social isolation elicits deficits in the ability of newly weaned female pigs to recognize conspecifics. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 110, n. 1-2, p. 182-188, mar. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.023>

SPENCER, J. D. et al. Early weaning to reduce tissue mobilization in lactating sows and milk supplementation to enhance pig weaning weight during extreme heat stress. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 81, n. 8, p. 2041-2052, aug. 2003. <https://doi.org/10.2527/2003.8182041x>

SPINKA, M. How important is natural behaviour in animal farming systems? **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v.100, n. 1-2, p. 117-128, oct. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.04.006>

SUMNER, B. E. et al. Early weaning results in less active behaviour, accompanied by lower 5-HT1A and higher 5-HT2A receptor mRNA expression in specific brain regions of female pigs. **Psychoneuroendocrinology**, Oxford, v. 33, n. 8, p. 1077-1092, sep. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.05.004>

TENORIO-LOPES, L. et al. Neonatal maternal separation opposes the facilitatory effect of castration on the respiratory response to hypercapnia of the adult male rat: Evidence for the involvement of the medial amygdala. **Journal of Neuroendocrinology**, Eynsham, 29, n. 12, doi: 10.1111/jne.12550., dec. 2017. <https://doi.org/10.1111/jne.12550>

THAKER, M. Y. C.; BILKEI, G. Lactation weight loss influences subsequent reproductive performance of sows. **Animal reproduction science**, Amsterdam, v. 88, n. 3-4, p. 309-318, sep. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.10.001>

TOKACH, M. D. et al. Quantitative influence of lysine and energy intake on yield of milk components in the primiparous sow. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 6, p. 1864-1872, jun. 1992. <https://doi.org/10.2527/1992.7061864x>

TOKI, S. et al. Importance of early lighting conditions in maternal care by dam as well as anxiety and memory later in life of offspring. **The European journal of neuroscience**, Oxford, v. 25, n. 3, p. 815-829, feb. 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05288.x>

VAN NIEUWAMERONGEN, S. E. et al. A review of sow and piglet behaviour and performance in group housing systems for lactating sows. **Animal**, Cambridge, v. 8, n. 3, p. 448-460, mar. 2014. <https://doi.org/10.1017/S1751731113002280>

VARLEY, M. A.; WISEMAN, J. **The Weaner Pig: Nutrition and Manegement**. Cabi Publishing, Oxon, United Kingdom, 2001.

VICENTIC, A. et al. Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic 1A receptors in rat brain. **Neuroscience**, Oxford, v. 140, n. 1, p. 355-365, jun. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.02.008>

WEARY, D.; APPLEBY, M.; FRASER, D. Responses of piglets to early separation from the sow. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 63, n. 4, p. 289-300, apr. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(99\)00021-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(99)00021-0)

WEAVER, I. C. et al. Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1024, p. 182-212, jun. 2004. <https://doi.org/10.1196/annals.1321.099>

WEAVER, I. C. G. et al. The transcription factor nerve growth factorinducible protein A mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, Washington, v. 27, n. 7, p. 1756-1768, feb. 2007. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4164-06.2007>

WHEELER, M. B. Production of transgenic livestock: promise fulfilled. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 3, p. 32-37, 2003. https://doi.org/10.2527/2003.81suppl_332x

WIJTEN, P. J. A.; VAN DER MEULEN, J.; VERSTEGEN M. W. A. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: A review. **The British journal of nutrition**, Cambridge, v. 105, n. 7, p. 967-981, apr. 2011. <https://doi.org/10.1017/S0007114510005660>

WU, X. et al. Effects of oral supplementation with glutamate or combination of glutamate and N-carbamylglutamate on intestinal mucosa in piglets. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 4, p. 337-339, dec. 2012. <https://doi.org/10.2527/jas.53752>

ZHU, L. H. et al. Impact of weaning and an antioxidant blend on intestinal barrier function and antioxidant status in pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 8, p. 2581-2589, aug. 2012. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-4444>

ZIJLSTRA, R. T. et al. Effect of feeding a milk replacer to early-weaned pigs on growth, body composition, and small intestinal morphology, compared with suckled littermates. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 74, n. 12, p. 2948-2959, dec. 1996. <https://doi.org/10.2527/1996.74122948x>

**CAPÍTULO II – DESCRIÇÃO DAS TÉCNICAS E ANÁLISES DESENVOLVIDAS NO
EXPERIMENTO SOBRE O DESMAME PRECOCE**

1 INTRODUÇÃO

O desmame precoce realizado em muitas granjas comerciais é consequência da superprodução de leitões pelas fêmeas hiperprolíficas. Apesar da realidade do nascimento de leitões supranumerários, os efeitos do desmame precoce precisam ser analisados de forma criteriosa. As alterações físicas, como o novo ambiente e contato com novos indivíduos, mudanças fisiológicas, como alteração da dieta, ou modificações psicológicas decorrentes do desmame precoce, resultam em piora do crescimento durante os primeiros dias após o desmame. Consequentemente, a prática do desmame precoce acarreta diversas alterações comportamentais, fisiológicas e neuroendócrinas no leitão.

Do ponto de vista produtivo e zootécnico, o desmame precoce é praticado por várias granjas uma vez que há uma preocupação com a fêmea lactante, e os possíveis prejuízos produtivos e reprodutivos. A vantagem do desmame precoce é que ele promove rápido retorno ao cio da matriz, maior produção de leitões por fêmeas ao ano, além de menor contato dos leitões com microrganismos infecciosos que colonizam as matrizes. Por outro lado, quando se trata do comportamento do leitão, o desmame precoce pode aumentar a agressividade, ansiedade, depressão, vocalizações, medo e distúrbios neuronais que podem comprometer o desempenho.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, processo de número 072/19 (em anexo 1). O delineamento do experimento foi em seis blocos casualizados com 24 repetições de cada tratamento. Os tratamentos foram desmame precoce aos dez dias (tratamento), e o desmame convencional utilizado na granja, aos 21 dias (controle). A cada bloco, foram utilizados 12 leitões de quatro fêmeas suínas, totalizando 48 animais. Portanto, em seis blocos, foram utilizados 288 animais no total. Para realizar a análise do comportamento animal e distúrbios neuroendócrinos, diferentes testes e técnicas moleculares, que serão apresentados a seguir, foram realizados

2 ANÁLISE DE LESÕES CUTÂNEAS NOS ANIMAIS

A quantidade de lesões corporais na pele do animal é indicativa de comportamento agressivo (GUY et al., 2009). As lesões físicas na pele ocorrem após o agrupamento para estabelecer a nova hierarquia, resultando em lesões e estresse entre suínos de diferentes origens. O momento após o agrupamento é crítico nas primeiras 24 horas devido às brigas por disputa de hierarquia (DONG; PLUSKE, 2007). Após esse período, ocorre o estabelecimento da nova hierarquia, e os animais cessam as brigas.

Os animais desmamados precocemente podem aumentar o comportamento agressivo, que compromete a memorização de suínos desmamados com menos de três semanas de idade (SOUZA; ZANELLA, 2008). Yuan et al. (2004) verificaram que leitões desmamados entre 9 e 12 dias de idade brigaram mais vezes se comparados com leitões desmamados entre 21 e 23 dias de idade, quando foram reagrupados às 9 semanas de idade. Sendo assim, animais desmamados podem continuar rivalizando por um período maior, devido ao comprometimento da memorização ao estabelecimento da nova hierarquia.

No presente estudo, foram realizadas mensurações das lesões cutâneas no dia do desmame (aos dez dias de idade), 24, 48 horas, e quatro dias após o desmame. A hipótese é que animais desmamados precocemente, com a ausência da mãe, continuam a brigar mesmo após estabelecer uma hierarquia. Isso ocorre por causa do aumento do estresse e cortisol dos animais que provoca uma desregulação no hipocampo, que é responsável pela memorização.

Um total de seis fotografias de cada animal foram realizadas, com a vista lateral direita do corpo, parte externa e interna da orelha e face direita, parte externa e interna da orelha e face esquerda, e lateral esquerda do corpo do animal. Em seguida, as lesões foram contadas. Após o primeiro dia de contagem, apenas as novas lesões eram contabilizadas, identificadas de acordo com a vermelhidão e aspecto de lesão recente. O procedimento das fotografias foi realizado em todos os animais do experimento, ou seja, 288 animais, 144 do controle, e 144 do grupo de leitões desmamados precocemente. As fotografias foram tomadas a partir de uma câmera com 12 megapixels e lente de grande abertura f/1.7 com 1/2.5 de tamanho.

3 TESTE DO CAMPO ABERTO

O teste do campo aberto é utilizado em psicologia animal. Ele é realizado pela introdução de um animal em uma área plana e iluminada (WILSON et al., 1976), sendo

observado por períodos que variam de exposição aguda por alguns minutos, a exposições repetidas de várias horas. O teste do campo avalia a reação emocional e motivação exploratória, através da locomoção (CRAWLEY; GOODWIN, 1980). Os estudos na literatura, em sua maioria, abordam esse teste em ratos e camundongos (PRUT; BELZUNG, 2003; STEIMER; DRISCOLL, 2003).

No presente trabalho, o teste do campo aberto foi realizado em 20 animais (dez de cada tratamento), escolhidos aleatoriamente, nos 6 blocos do experimento, utilizando a metodologia de Puppe et al., 2007. Ao final, foram avaliados 120 animais. Gravações de cinco minutos de cada animal foram realizadas com uma câmera com 12 megapixels e lente de grande abertura f/1.7 com 1/2.5 de tamanho. As áreas utilizadas para o teste foram baias da creche da própria granja, com dimensão de 6 m², e piso de plástico, 40 cm x 50 cm. Foram cobertos cochos da granja presentes na baia de teste para não desviar atenção dos animais.

Após realizada as gravações, a permanência do animal no centro e nalateral da baia, foram mensurados em segundos, além da quantidade de vocalização dos animais (ALMEIDA, 2016). O aumento da vocalização com alta tonalidade semelhantes a gritos são mais usadas em estado de excitação e estresse (SCHRADER; TODT, 1998).

4 TESTE DO OBJETO NOVO

As interações dos animais com o ambiente ocorrem de acordo com experiências do presente ou passado, e podem ser interpretadas de acordo com o estado emocional (WIEPKEMA; KOOLHAAS, 1992). Portanto, a forma do animal interagir com o ambiente, e lidar com a situação pode ser uma fonte de emoções positivas, aumentando o bem-estar dos animais (DANTZER, 2002). Porém, a inclusão de novos objetos pode gerar medo. O medo é uma resposta à percepção da aproximação do perigo com instinto imediato de luta ou fuga (BOISSY, 2007).

Os testes comportamentais, como o teste de reação a objeto novo são utilizados para avaliar o medo e ansiedade de animais. Para realizar este teste, é necessária a utilização de animais saudáveis e aptos para detectar a variação do comportamento (BOISSY et al., 2007). O objeto pode ser colocado na área do teste antes ou após a entrada do animal. Durante a sua permanência, a frequência, duração e o tempo para a primeira aproximação ao objeto são

mensurados. Os testes comportamentais devem ser realizados de forma combinada a outras avaliações para evitar conclusões equivocadas (FORKAMAN et al., 2007).

No presente estudo, após as gravações de cinco minutos do teste do campo aberto, foi realizado o teste do objeto novo, com a inclusão no centro da baia de um cone de sinalização cônico, de cor alaranjada e de com 50 cm de tamanho. As gravações desse teste foram realizadas após os cinco minutos do teste do campo aberto. Assim como no teste do campo aberto, o teste do objeto novo foi realizado em 20 animais (dez de cada tratamento), escolhidos aleatoriamente, nos 6 blocos do experimento, totalizando 120 animais analisados (60 animais que foram desmamados aos dez dias, e 60 animais desmamados aos 21 dias). Foi mensurada a quantidade de vocalizações do animal, a latência para interação com o cone, tempo de interação e exploração do objeto, e o tempo que o animal ficou próximo do objeto, medidos em segundos.

5 TEMPO DE EMBARQUE

O embarque dos animais para transporte até o frigorífico é considerado o momento crítico e estressante na produção de suínos. O medo e a reatividade ao estresse são maiores em suínos manuseados de forma irregular (HEMSWORTH; BARNETT; HANSEN, 1987). Foi demonstrado que suínos que foram manejados anteriormente, antes do embarque e do transporte, são mais fáceis de manusear que os animais inexperientes (ABBOTT et al., 1997). Portanto, é provável que interações entre pessoas e suínos induzem o medo, e poderão ter um impacto negativo nas respostas relacionadas ao bem-estar animal.

O tempo de embarque pode ser utilizado para análise comportamental e a hipótese é que, animais com medo ou estressados que foram desmamados precocemente, apresentariam um tempo diferente de passagem desde a granja até a chegada ao caminhão, se comparados com animais desmamados aos 21 dias de idade. No estudo, o tempo de embarque de suínos dos diferentes tratamentos foi analisado. Como a passagem individual de cada animal no corredor era inviável na prática, os animais foram divididos grupos de 5 ou 6 animais, do mesmo tratamento. A contagem do tempo, em segundos, foi realizada desde o corredor de acesso da granja até o caminhão de transporte. A passagem dos animais pelos corredores da granja foi realizada de forma calma e tranquila, sem agressividade, gritos e reações bruscas direcionadas aos suínos.

6 ANÁLISES EPIGENÉTICAS

Existem quatro classes de modificações epigenéticas descritas, sendo elas a remodeladores da cromatina, metilação de DNA, modificações pós-traducionais de histonas, e por fim, os RNA não codificadores - ncRNAs (FINGERMAN et al., 2013). A metilação do DNA envolve adição de um grupo metil em citosinas de sítios CpG, promovida pelas enzimas metiltransferases (DNMTs). Essa modificação do DNA é herdável e não modifica a sequência original do DNA, sendo que é a principal forma de silenciamento gênico epigenético em mamíferos (DEATON; BIRD, 2011). A hipótese do estudo é que, diante de um estresse provocado pelo desmame precoce em suínos, ocorra uma hipermetilação da região de ligação do fator de crescimento do nervo I induzido pela proteína A (NGFI-A) no promotor do exon 1(7) do gene *NR3C1*.

Para identificar a metilação do DNA, são realizadas técnicas moleculares como o uso de endonucleases de restrição sensíveis à metilação, análise de metilação global, análise de metilação gene-específica etc. A maioria das técnicas utilizada o tratamento com bissulfito de sódio, que converte citosinas não metiladas de dinucleotídeos CpG em uracila, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas (LAIRD, 2003). Após o tratamento com bissulfito, a avaliação do DNA pode ser realizada pelo sequenciamento do tipo Sanger, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) específica de metilação, avaliação da curva de dissociação em PCR em tempo real, análise de conformação em fita simples sensível à metilação, extensão por *primer* de nucleotídeo único, entre outras técnicas (NICIURA; PERECIN, 2014).

No presente trabalho, as avaliações epigenéticas foram realizadas na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN), localizada na cidade de Brasília-DF. A avaliação consiste nas seguintes etapas: extração do DNA, tratamento do DNA com bissulfito de sódio, amplificação do DNA por PCR, purificação do produto da PCR, ligação do DNA (*Amplicons*) e vetor (Plasmídeo), transformação em bactérias, cultivo das bactérias em tubo, extração do DNA plasmidial, digestão enzimática, e em seguida, eletroforese de gel de agarose, e por fim, sequenciamento do tipo Sanger. Após a realização de todas as etapas, foram analisadas as sequências de DNA. O detalhamento da técnica está descrito a seguir.

6.1 Extração de DNA pelo método de “salting-out”

O protocolo de extração de DNA foi baseado no artigo de Biase et al. (2002), com algumas adaptações. Na primeira etapa, as amostras de parte do sistema nervoso central, (hipocampo), que inicialmente estavam armazenadas em freezer a - 80 °C, foram descongeladas e pesadas. Em seguida, as amostras foram moídas com a presença de nitrogênio líquido em cadinho de laboratório, e adicionadas em 600 µl de uma solução de lise nuclear no microtubos (50 mM Tris-HCL, pH 7,8; EDTA 25 mM e NaCl 400 mM, 1% de Dodecil sulfato de sódio - SDS). No momento de utilizar a solução de lise, foram adicionadas 16,5 µl proteinase K (10 µg/µL) e 33 µl de RNase (50 µg/µL). Após a adição da solução de lise nuclear, todo o material alocado em microtubos foi incubado em banho-maria a 55° C *overnight*.

A segunda etapa de extração do DNA se inicia com a adição de 200 µl de solução de precipitação de proteína (NaCl 6M). O material foi incubado no gelo por 5 minutos, e em seguida foi centrifugado a 4 °C por dez minutos na velocidade máxima. Após a centrifugação, retirou-se o sobrenadante, e neste foi adicionado 600 µl de isopropanol gelado, e armazenado no freezer durante uma hora. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 4 °C em velocidade máxima, sendo o sobrenadante descartado. O *pellet* formado na centrifugação foi lavado duas vezes com 1200 µl de etanol 70%. Nessa lavagem, foi realizada a centrifugação por dez minutos a 4 °C em velocidade máxima. Em seguida, o *pellet* foi secado em temperatura ambiente.

Na última etapa, o DNA extraído foi reidratado em solução de suspensão (solução TE - Tris HCl 25 mM, pH 8.0; EDTA 20 mM), e a quantidade de solução utilizada foi dependente do tamanho do DNA. No presente estudo foi utilizado 50 µl de TE. O material foi colocado em banho-maria a 50 °C a 20 minutos para completa ressuspensão do DNA. Para confirmar a qualidade e quantidade de DNA extraído, foi realizada a quantificação do material com a utilização de espectrofotômetro (NanoDrop®), e eletroforese de gel de agarose corado com brometo de etídio sob luz ultravioleta para avaliar a degradação do DNA. Ao final, o material foi armazenado no congelador a -20 °C.

6.2 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

O tratamento de DNA com bissulfito de sódio converte as citosinas não metiladas em uracilas, ou timinas após a PCR, enquanto as citosinas metiladas permanecem como citosinas. A análise da metilação do DNA inclui quatro estágios principais, sendo eles, a desnaturação, conversão de bissulfito, amplificação e análise por PCR (CLARK et al, 2006). As reações químicas que ocorrem na desaminação da citosina pelo bissulfito são: 1) sulfonação, com adição de bissulfito à dupla ligação 5-6 da citosina; 2) desaminação hidrolítica para produzir a uracila sulfonada, resultando em um derivado uracila-bissulfito; 3) dessulfonação alcalina: remoção do sulfonato por um tratamento alcalino, para converter em uracila (PATTERSON et al., 2011).

Para realizar o tratamento do DNA com bissulfito de sódio no presente trabalho, o kit EZ DNA Methylation-Lightning® (Zymo Research, Orange, CA, USA) foi utilizado. O DNA extraído e quantificado foi diluído para atingir a concentração recomendada pelo kit de 500 ng de DNA. Todas as etapas executadas foram seguidas de acordo com as instruções de utilização do kit comercial mencionado acima. Segundo Fraga e Esteller (2002), são necessários cuidados em todas as etapas em relação à temperatura e tempos de incubação para garantir a integridade do DNA. Ademais, o bissulfito é facilmente oxidado pelo ar. Nesse processo, os radicais livres formados podem causar rupturas na cadeia de DNA (HAYATSU, 2008).

Após todo o protocolo de tratamento com bissulfito de sódio utilizando o kit comercial, as amostras foram armazenadas em microtubos na temperatura de -80 °C. Para avaliar o DNA tratado com bissulfito de sódio, foi realizado o sequenciamento do tipo Sanger ou sequenciamento de bissulfito.

6.3 Análise da metilação do DNA

A avaliação da metilação com sequenciamento possibilita a identificação do status de metilação de cada sítio CpG individualmente. Para que a análise fosse alcançada, foi utilizado *primers*, que amplificam a região promotora do gene *NR3C1*, com base no artigo de Weaver et al. (2004). O estudo citado foi realizado em ratos, portanto, foi feita uma comparação entre a sequência de DNA do gene *NR3C1* de ratos e suínos no site *Blast nucleotide*, e foi apresentada uma semelhança de 76,42%.

Em seguida, no site *UCSC Genome Browser* e *Primer Seeker Zymo*, foram desenhadas duas sequências de *primers* (nested PCR, *outer* e *inner* para amostras com pouco material

genético), que foram utilizadas para flanquear e amplificar as 48 ilhas de citosina-fosfato-Guanina (CpG) no *outer*, e 39 ilhas CpG no *inner* (*amplicon* de 301 pb), em sequências repetitivas de DNA no experimento. Nested PCR é uma extensão da técnica de PCR, que utiliza dois conjuntos de *primers* (*outer* e *inner*), para aumentar a sensibilidade e/ou especificidade da PCR (GREEN; SAMBROOK, 2019).

Adicionalmente, foi utilizado dois tipos de *primers*, *forward* e *reverse*, que hibridizam com as fitas opostas do DNA, flanqueando o segmento a ser amplificado, de modo a permitir a atuação da DNA polimerase para síntese da cadeia complementar. No experimento, o *primer* para PCR *inner* do gene *NR3C1* apresenta 301 pares de bases, e quantidade de 39 ilhas de CpG. A hipótese apresentada é que a região promotora de ligação do NGFI-A ao promotor do gene *NR3C1* esteja hipermetilada nos animais desmamados aos 10 dias de idade. As informações sobre a quantidade de ilhas CpG, e a sequência genômica do gene *NR3C1* em suínos, que está na região promotora, estão apresentados nos anexos 2 e 3, respectivamente.

Após a realização do desenho dos *primers*, foi realizada a diluição dos *primers* (*outer* e *inner*) e preparação da solução estoque (100 pmol/μL de *forward* e *reverse*) e solução de trabalho (10 pmol/ μL de *forward* e *reverse*). Os componentes utilizados para realização do PCR no laboratório da Embrapa foram: DNA extraído e quantificado, solução tampão Taq, cloreto de magnésio (MgCl₂), nucleotídeos (desoxirribonucleotídeos fosfatados – dNTPs), *primers* (*forward* e *reverse*) e Taq DNA polimerase.

As etapas de PCR são desnaturação, hibridização ou anelamento, e por fim, extensão. A técnica detalhada consiste basicamente em três etapas: a dupla fita de DNA é desnaturada pelo calor, com a temperatura de 94 a 97°C. Em seguida, cada *primer* (*forward* e *reverse*) anela a uma das fitas simples do DNA e por fim, ocorre o processo de extensão e polimerização da fita, a partir da adição de nucleotídeos e ação da Taq DNA polimerase (ERLICH, 1995).

O protocolo seguido para a reação de PCR *outer* realizado na Embrapa foi a preparação de um volume total de 20 μL, compreendendo 1x tampão Taq, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 1 U Platinum™ Taq polimerase (Invitrogen, CA, EUA), 10 pmol de *primer* (*forward* + *reverse*) e 3 μL de DNA tratado com bissulfito. Para completar o volume final de 20 μL, foi preenchido com água RNase-free. A diferença do protocolo de PCR *outer* e *inner*, foi que neste último foi utilizado apenas 1 μL de DNA tratado com bissulfito.

No termociclador, foram realizadas diversas tentativas de variações de temperaturas e ciclos na etapa de desnaturação. Sendo assim, as duas etapas do PCR (*outer* e *inner*) foram realizadas nas seguintes temperaturas e ciclos: *outer* a 51,8 °C com 35 ciclos, e *inner* a 60 °C com 29 ciclos, descritas a seguir. As etapas de amplificação para PCR *outer* foram: etapa de

desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 51,8 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, com extensão final a 72 °C por 15 min. As etapas no termociclador para PCR *inner* foram: etapa de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguido de 29 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, com extensão final a 72 °C por 15 min.

Após a PCR, foram formados fragmentos (*amplicons*) de DNA de interesse no presente estudo. Os *amplicons* foram purificados a partir da eletroforese de gel de agarose. Esse procedimento é realizado após o PCR *inner*. A eletroforese é uma técnica laboratorial para separar moléculas de acordo com a sua carga e sua massa, quando se aplica uma corrente elétrica entre eletrodos, induzindo a separação. Quando se trata de ácidos nucleicos, que possuem carga negativa em pH neutro, irão migrar em direção ao eletrodo positivo. Os fragmentos de ácido nucleicos menores deslocam-se mais que os maiores em uma separação eletroforética. Quanto maior a voltagem, mais rápida é a corrida em gel (CAMPBELL; FARRELL, 2007).

A purificação do DNA foi realizada utilizando o kit The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (US Promega Corporation, Madison, WI, USA). Após a purificação, os *amplicons* foram clonados em vetor, seguindo as instruções do kit TOPO TA Cloning vector (pCRII-TOPO® vector system, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A clonagem bacteriana foi realizada em três etapas: 1) ligação do DNA (*amplicons*) e vetor (plasmídeo); 2) transformação bacteriana; 3) cultivo bacteriano em 15 tubos.

A ligação do *amplicon* com vetor foi realizada através do kit já mencionado, TOPO TA Cloning®. A transformação bacteriana (vetor e *amplicons* com a bactéria competente em 2 a 3 placas - *Escherichia coli* DH5 α .) foi realizada através de um protocolo de choque térmico, e o produto foi espalhado em placas de petri contendo ágar com ampicilina 100 μ g/mL, com a utilização de 40 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo (X-Gal - Sigma) e de 100 mM de isopropil- β -Dtiogalactopiranosídeo (IPTG - Sigma), seguida por inversão das placas e incubação em estufa a 37°C por 14 horas e posteriormente a 4°C por duas horas.

Após a incubação das placas em estufa, as colônias brancas com inserto (β -gal inativa, positivas) foram selecionadas. Foi utilizado um palito de madeira estéril para a retirada da colônia branca da placa de cultivo e sua deposição no tubo de 15 mL contendo 3 mL de meio LuriaBertani (LB). Os tubos permaneceram sob agitação de 250 rotações por minuto (rpm) a 37°C por 16 horas em agitador automático.

Em seguida, o DNA plasmidial foi isolado utilizando o kit Pure Yield Plasmid Miniprep System® (US Promega Corporation, Madison, WI, USA). Após a realização do protocolo de Miniprep, as amostras mantidas no gelo, foram quantificadas no espectrofotômetro. A última etapa antes do sequenciamento, é a digestão enzimática, com a utilização da enzima de restrição (ECORI) para confirmação do inserto. Estas enzimas são utilizadas pela bactéria *Escherichia coli* para cortar o DNA viral que penetram em seu citoplasma. Após as amostras ficarem overnight a 37 °C, foi realizada a eletroforese, e em seguida, foram armazenadas a -20 °C até a realização do sequenciamento Sanger.

O sequenciamento do tipo Sanger é realizado através de cada 5-metil-citosina (5mC) que aparece citosina, e cada uracila, que originalmente era uma citosina não metilada, como timina. O sequenciamento pode ser realizado direto com o produto de PCR, porém, devido à perda da complementaridade entre as fitas de DNA e inespecificidade de leitura no sequenciamento, é recomendada a clonagem do produto de PCR para analisar a molécula de forma individual e específica (NICIURA; PERECIN, 2014).

No experimento, foram realizadas análises da metilação do gene *NR3C1* em amostras do hipocampo de animais desmamados aos dez dias (tratamento) e aos 21 dias (controle), divididos em 4 categorias: macho controle, fêmea controle, macho tratamento e fêmea tratamento). Foi realizada a comparação entre controle macho versus controle fêmea, tratamento macho versus tratamento fêmea, controle macho versus tratamento macho, e controle fêmea versus tratamento fêmea, através do site *Quantification tool for Methylation Analysis* (QUMA). Os dados foram comparados entre os grupos experimentais usando o teste de Mann-Whitney, e a comparação de citosina entre os grupos foi realizada pelo teste de Fisher. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão dos grupos experimentais, e o valor de $p \leq 0,05$ denota uma diferença estatística significativa.

7 EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

A expressão gênica é o processo de formação de proteínas ou RNA mensageiro (RNAm) através de uma sequência de DNA. O DNA é transcrito para RNA que, por sua vez, pode ou não ser traduzido em proteína. Sendo assim, a expressão gênica é um fenótipo intermediário entre a sequência gênica e um distúrbio. Uma modificação epigenética, como a metilação de

DNA, pode regular a expressão gênica sem alterar a sequência de nucleotídeos do DNA. Diversos estudos demonstraram que eventos epigenéticos estão envolvidos no desenvolvimento embrionário, na regulação da expressão gênica e na estabilidade genômica (MARGUERON; REINBERG, 2010; XU et al., 2014). Para mensurar a expressão gênica, realiza-se a técnica de PCR em tempo real (*Real Time Quantitative* PCR – RT qPCR), que é medida pelo acúmulo de RNA mensageiro.

A qPCR mantém as características de sensibilidade, além de incrementar a especificidade e a precisão na quantificação do produto amplificado a partir de uma amostra biológica. Essa quantificação foi possível pelo sistema de detecção do DNA amplificado em tempo real, que não requer tantas manipulações no preparo das reações de amplificação, as quais são fontes potenciais de alteração dos resultados (HEID et al., 1996). A qPCR ou PCR em tempo real monitora a fluorescência associada à síntese de um *amplicon* ao longo dos ciclos da PCR, em oposição ao ponto final na técnica convencional (HIGUCHI, 1992).

A técnica de qPCR é semelhante ao PCR convencional, com ciclos subsequentes nos quais ocorrem a desnaturação do DNA em fitas simples por aquecimento, o anelamento de *primers* a sequências complementares específicas nas fitas simples de DNA e, por fim, a extensão de novas fitas complementares, mediada por uma enzima DNA polimerase termoestável. Ao final do procedimento ocorre um aumento do número de *amplicons* ao longo dos ciclos da reação. No entanto, na técnica de qPCR, o aumento é registrado em tempo real ao longo da fase exponencial por meio da detecção do sinal de uma fluorescência repórter (MORGANTE; BLAWID, 2016).

No presente estudo, o delineamento foi em esquema fatorial com dois fatores (fator 1: gênero-tratamento com 4 níveis; fator 2: gene com 5 níveis), totalizando $4 \times 5 = 20$ tratamentos. A variável resposta é um valor numérico referente a uma razão (*ratio*) da expressão gênica (EG), que por sua vez é uma variável contínua positiva. A base de comparação escolhida foi o fator macho controle de cada gene e foram realizadas cinco repetições.

Inicialmente foi realizada a extração do RNA das amostras do hipocampo de suínos através do kit PureLink™ RNA mini (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), e foram seguidas todas as instruções. O tecido de aproximadamente 200 mg foi macerado com nitrogênio líquido em um cadinho, e em seguida foi realizada a mistura do tecido macerado com solução trizol (mistura de tiocianato de guanidina e fenol), que é um reagente para o isolamento simultâneo de RNA. Para cada 50 a 100 mg de amostra, foram adicionados 1 mL de trizol. Foi realizada a homogeneização com a pipeta de 1000 µL. Em seguida foi realizada a incubação em gelo por cinco minutos, e após, adicionado 0,2 mL de clorofórmio gelado. Em

seguida, a amostra foi incubada em gelo por dois a três minutos. Em seguida, foi realizada a centrifugação por 15 minutos a 12.000 g a 4 °C. Depois, 600 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo.

Após a lise do RNA com trizol, foi realizada a ligação do RNA à membrana. Todas as etapas foram realizadas através do protocolo padrão do kit. Foi adicionado 600 µL de etanol 70% gelado, e foi agitada em vórtex. Em seguida, foi realizada a centrifugação 12.000 g por 15 segundos, e descartado o eluído. Foi realizada então a transferência de 600 µL, e foi realizada novamente a centrifugação, e descartado o eluído.

Após a ligação do RNA à membrana, foi realizada a lavagem do material extraído, com adição de 350 µL de wash buffer I na coluna, e centrifugado 12000 g por 15 segundos. Foi transferido o conteúdo para um novo tubo, e adicionado 80 µL do MIX DNase e incubado em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 350 µL de wash buffer I e centrifugado a 12.000 g por 15 segundos. Após, foi reinserido a coluna em novo tubo coletor, e adicionado 500 µL de wash buffer II e centrifugado a 12.000 g por 15 segundos. Foi descartado o eluído, e repetido a lavagem com wash buffer II. Foi centrifugado o conteúdo a 12.000 g por 1 minuto com a tampa da coluna aberta, e inserido a coluna em tubo de 1,5 mL do kit. Após a extração, foi realizada a eluição com água RNase-free e quantificação no espectrofotômetro (NanoDrop®). As amostras foram então armazenadas a - 80 °C.

Após a extração, 5 µg de RNA foi tratado com 5U da enzima DNase I (5 µg de RNA, 1U/ µg de DNase I, 1 µL de buffer 10X, e µL de água nuclease-free) e incubados a 37 °C por 30 minutos, seguido de 75 °C por dez minutos. Após esse processo, foi realizada a purificação do RNA tratado com o kit RNeasy Plus Micro kit (Qiagen Samples e Assay Technologies®). Para realizar a síntese de cDNA, foi utilizado o kit GoScript Reverse Transcriptase (US Promega® Corporation, Madison, WI, USA), seguindo todo o protocolo descrito no kit.

Por fim, para a realização do qPCR, foi utilizado o kit GoTaq qPCR Master Mix (US Promega® Corporation, Madison, WI, USA). O procedimento foi realizado na máquina de RT-qPCR: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Para a reação, foram utilizados GoTaq (12,5 µL por reação), água nuclease-free (8,8 µL), e os *primers* (200nM/cada, 1,0 µL). A condição do PCR foi: 95 °C por 5 min, seguido de 50 ciclos de desnaturação a 95 °C/15 s e anelamento e extensão a 60 °C/1 min. Foram feitas cinco placas no total, e três repetições de cada grupo (macho controle, fêmea controle, macho tratamento, fêmea tratamento) de cada gene.

Os genes estudados no experimento foram: 1) *NR3C1*, gene que codifica os receptores de glicocorticoides (GR), essencial para a interação entre cortisol e mecanismos fisiológicos;

2) *NR3C2*, gene que codifica os receptores de mineralocorticoides (MR), relacionados com a neurogênese e diferenciação dos neurônios no hipocampo. A ausência de MR ocasiona um defeito na flexibilidade comportamental e falta de controle de respostas, e as ações coordenadas de GR e MR no hipocampo influenciam nos comportamentos emocionais e cognitivos; 3) *FKBP5*, gene prolil isomerase 5-gene codificador da proteína FKBP51, envolvido com a sensibilidade dos GR ao cortisol; 4) *HTR1A*, gene que codifica os receptores serotoninérgicos 5HT-1a, sendo que a serotonina induz aumento de NGFI-A na transcrição de GR em neurônios do hipocampo; 5) *BDNF*, gene que codifica o fator neurotrófico derivado do cérebro, importante na neurogênese, promovendo a formação e sobrevivência de novos neurônios. Os glicocorticoides podem atenuar a expressão de *BDNF*, reduzindo a neurogênese e plasticidade do sistema nervoso.

Além dos genes estudados, foram utilizados dois genes endógenos, *GAPDH* e β -actina, para controle da qPCR. O cálculo da eficiência foi realizado pelo kit GoTaq qPCR Master Mix (US Promega Corporation, Madison, WI, USA). A curva de eficiência dos *primers* foi realizada com cinco pontos e fator de diluição 1:4, realizado em triplicata, tendo como ponto inicial a quantidade de 1 μ L de cDNA (cDNA sintetizado com 5 μ g de RNA não purificado). A eficiência dos *primers* foram entre 90% e 100%. Os níveis de mRNA foram normalizados usando a média geométrica dos genes endógenos β -actina e *GAPDH*, e a quantificação relativa foi calculada pelo método $\Delta\Delta C_t$, com correção de eficiência segundo Pfaffl (2001).

As comparações de expressão do gene entre os tratamentos foram realizadas por meio da análise de variância e teste de Tukey (dados paramétricos) ou Kruskal-Wallis e Mann Whitney (dados não-paramétricos). As análises estatísticas sobre a expressão gênica foram realizadas com o uso do programa RAPHAD Prism versão 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA, www.graphpad.com).

REFERÊNCIAS

ABBOTT, T. A. et al. The effect of experience of handling on pigs willingness to move. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 54, n. 4, p. 371-375, nov. 1997. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(97\)00045-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(97)00045-2)

ALMEIDA, Thiago Bernardino de. **Bem-estar de fêmeas suínas gestantes alimentadas com diferentes níveis de fibra e consequências no comportamento dos leitões ao desmame**. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em:

<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-02062016-150442/>. Acesso em: 23 nov. 2022.

BIASE, F. H. et al. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 3, p. 313-315, aug. 2002. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000300011>

BOISSY, A. et al. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. **Physiology of Behavior**, Oxford, v. 92, n. 3, p. 375-397, oct. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.02.003>

CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S.O. **Bioquímica**. v. 2, 5. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007.

CLARK, S. J. et al. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. **Nature Protocols**, London, v. 1, n. 5, p. 2353-2364, 2006. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.324>

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, Phoenix, v. 13, n. 2, p. 167-170, aug. 1980. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90067-2](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90067-2)

DANTZER, R. Can farm animal welfare be understood without taking into account the issues of emotion and cognition. **Journal of Animal Science**, Oxford, v. 80, n. 1-2 (E. Suppl. 1), E1-E9, jan. 2002. <https://doi.org/10.2527/animalsci2002.00218812008000ES10002x>

DEATON, A. M.; BIRD, A. CpG islands and the regulation of transcription. **Genes and Development**, Cold Spring Harbor, v. 25, n. 10, p. 1010-1022, may. 2011. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>

DONG, G.; Z.; PLUSKE, J. R. The Low Feed Intake in Newly-weaned Pigs: Problems and Possible Solutions. **The Asian – Australasian Journal Animal Science**, vol. 20, n. 3, p. 440-452, mar. 2007. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.440>

ERLICH, A. E. PCR Tecnologic. In MEYERS, R.A. **Molecular biology and biotechnology**. A comprehensive desk reference. New York: Vch. p.641-648, 1995.

FINGERMAN, I. M. et al. NCBI epigenomics: what's new for 2013. **Nucleic Acids Research**, London, v. 41, p. D221-D225, jan. 2013. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1171>

FORKMAN, B. et al. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. **Physiology of Behavior**, Oxford, v. 92, n. 3, p. 340-374, oct. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.03.016>

FRAGA, M. F.; ESTELLER, M. DNA Methylation: A Profile of Methods and Applications. **BioTechniques**, London, v. 33, n. 3, p. 632-649, sep. 2002. <https://doi.org/10.2144/02333rv01>

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2019, n. 2, doi:10.1101/pdb.prot095182. PMID: 30710024, feb. 2019. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095182>

GUY, J. H. et al. Reducing post-mixing aggression and skin lesions in weaned pigs by application of a synthetic maternal pheromone. **Animal Welfare**, Cambridge, v. 18, n. 3, p. 249-255, aug. 2009. <https://doi.org/10.1017/S09627286000049X>

HAYATSU, H. The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 659, n. 1-2, p. 77-82, jul-aug. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.04.003>

HEID, C.A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v. 6, n. 10, p. 986-994, oct. 1996. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>

HEMSWORTH, P. H.; BARNETT, J. L.; HANSEN, C. The influence of inconsistent handling by humans on the behaviour, growth and corticosteroids of young pigs. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 17, n. 3-4, p. 245-252, jun. 1987. [https://doi.org/10.1016/0168-1591\(87\)90149-3](https://doi.org/10.1016/0168-1591(87)90149-3)

HIGUCHI, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Bio/technology**, New York, v. 10, n. 4, p. 413-417, apr. 1992. <https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>

LAIRD, P. W. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nature reviews. Cancer**, London, v. 3, n. 4, p. 253-266, apr. 2003. <https://doi.org/10.1038/nrc1045>

MARGUERON, R.; REINBERG, D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. **Nature reviews. Genetics**, London, v. 11, n. 4, p. 285-296, apr. 2010. <https://doi.org/10.1038/nrg2752>

MORGANTE, C. V.; BLAWID, R. **Análise da expressão gênica pela técnica de PCR quantitativa em tempo real: princípios e fundamentos** / Carolina Vianna Morgante, Rosana Blawid. – Petrolina: Embrapa Semiárido, 2016.

NICIURA, S. C. M.; PERECIN, F. Impressão genômica. In: **Epigenética: bases moleculares, efeitos na fisiologia e na patologia, e implicações para a produção animal e a vegetal**. Brasília: Embrapa; 2014.

PATTERSON, K. et al. DNA methylation: bisulphite modification and analysis. **Journal of visualized experiments**, Boston, v. 56, PMID: 22042230; PMCID: PMC3227193, oct. 2011. <https://doi.org/10.3791/3170>

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 29, n. 9, p. e45-e45. ISSN 0305-1048. may. 2001. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, feb. 2003. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01272-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272-x)

PUPPE, B. et al. Cognitive enrichment affects behavioural reactivity in domestic pigs. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 105, n. 1-3, p. 75-86, jun. 2007. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0402>

SCHRADER, L.; TODT, D. Vocal quality is correlated with levels of stress hormones in 451 domestic pigs. **Ethology**, Berlin, v. 104, n. 10, p. 859-876, oct. 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1998.tb00036.x>

SOUZA, A. S.; ZANELLA, A. J. Social isolation elicits deficits in the ability of newly weaned female pigs to recognize conspecifics. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 110, n. 1-2, p. 182-188, mar. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.03.023>

STEIMER, T.; DRISCOLL, P. Divergent stress responses and coping styles in psychogenetically selected Roman high-(RHA) and low-(RLA) avoidance rats: Behavioural, neuroendocrine and developmental aspects. **Stress: the international journal on the biology of stress**, London, v. 6, n. 2, 87-100, jun. 2003. <https://doi.org/10.1080/1025389031000111320>

WEAVER, I. C. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature Neuroscience**, New York, v. 7, n. 8, p. 847-854, aug. 2004. <https://doi.org/10.1038/nn1276>

WIEPKEMA, P. R.; KOOLHAAS, J. M. The emotional brain. **Animal Welfare**, Hertfordshire, v. 1, n. 1, p. 13-18, feb. 1992. <https://doi.org/10.1017/S0962728600014688>

WILSON, R. C. et al. Open-field behavior in muroid rodents. **Behavioral Biology**, New York, v. 17, n. 4, p. 495-506, aug. 1976. [https://doi.org/10.1016/s0091-6773\(76\)90901-9](https://doi.org/10.1016/s0091-6773(76)90901-9)

XU, J. et al. Prenatal nutrition deficiency reprogramed postnatal gene expression in mammals brain: Implications for schizophrenia. **The International Journal of Neuropsychopharmacology**, Cambridge, v. 18, n. 4, pyu054. doi:10.1093/ijnp/pyu054, oct. 2014. <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyu054>

YUAN, Y. et al. The influence of weaning age on post-mixing agonistic interactions in growing pigs. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 88, n. 1-2, p. 39-46, sep. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.01.012>

**CAPÍTULO III - EFFECT OF EARLY WEANING OF PIGLETS AT 10 DAYS OF
AGE ON PRODUCTIVE PERFORMANCE**

(Artigo submetido na revista Livestock Science)

Effect of early weaning of piglets at 10 days of age on productive performance

Stenia Severo Rabelo¹; Robson Carlos Antunes²; et al.

¹Veterinary Medicine Department at the Federal University of Uberlândia, Glória Campus, block 1CCG, room 211 A, highway BR 050, km 78, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil;

²Professor, Veterinary Medicine Department at the Federal University of Uberlândia, Glória Campus, block 1CCG, room 211 A, highway BR 050, km 78, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

Corresponding author: Stenia Severo Rabelo (steniasevero@hotmail.com; Belo Horizonte Street, 98, Morada do Sol, Patrocínio, Minas Gerais, Brazil, ZIP Code 38744-850)

Abstract

Early weaning is a management to solve problems resulting from the sows' hyperprolificity. The present study aimed to evaluate the weaning at 10 days of age of piglets transferred to the nursery. Piglets belonging to the treatment group was early weaned at 10 days and received milk replacer, while piglets in the control group was weaned at 21 days. Forty-eight animals were used, divided into two treatments, in 6 randomized blocks, totalizing 288 animals. Weights at 1, 10, 21, 66 and 163 days of age, and weight gains at each stage of rearing were evaluated. Measurements of hot carcass weight, backfat thickness, muscle thickness and percentage of lean meat were measured. There was no difference ($p < 0,05$) in weight at birth and at 10 days. From 21 days of age, the live weight and weight gain of the control animals was higher compared to the treatment. Regarding carcass traits, there was a statistical difference for muscle depth and carcass weight, and control animals obtained better results compared to the treatment group. Piglets weaned early at 10 days of age have a lower growth potential. Other alternatives than weaning at 10 days plus milk replacer are needed to produce the surplus piglets of hyperprolific sows.

Keywords: Pig farming, hyperprolificity, animal production, carcass, weight.

Introduction

The development of the world swine industry in recent years is characterized by the intensification of production processes, the increase in production scale and the use of technologies related to genetics, nutrition, reproduction and animal health. The advancement in genetic improvement provided an increase in the number of weaners/sow per year. Due to this increase, some challenges have arisen, especially in the lactation phase, in which the sow's requirement is greater than her physiological capacity. This negative energy balance in lactation phase increases the weaning estrus interval, in addition to decreasing the number of total born piglets in the subsequent farrowing (Strathe et al., 2017). Besides that, the amount of milk ingested per piglet is inadequate; the growth rate of piglets is limited by the milk supply, and consequently an increase in neonatal mortality occurs (Bruns et al., 2018). In addition, the lack of teats due to the large size of the litter can cause an increase in low birth weight piglets.

In Brazil, the practice of weaning is usually carried out from 21 to 28 days. Early weaning is an alternative that aims to solve the increase in catabolism caused by the hyperprolificity of the sow. However, animals early weaned tend to have difficulties in solid feeding ingestion. As a result, high technology and maximum digestibility dairy substitutes were developed, which aim to meet the nutritional requirements of the piglets. Therefore, the present study aimed to evaluate the performance of piglets weaned at 10 days of age, transferred to the nursery, using a commercial milk substitute.

Material and methods

All experimental procedures with the studied animals was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Uberlândia, ethics project 072/19.

The experiment was carried out in a farrow to finish commercial farm, with a herd of approximately 500 sows, located in the city of Patrocínio, state of Minas Gerais, Brazil. The

geographic coordinates of the farm are latitude 18° 56' 38" (S), longitude: 46° 59' 33" (W), and altitude of 965 m. Piglets from 24 hybrid sows (Large White x Landrace, DB-90 line), from 2nd to 6th farrowing order, were used. Sows were inseminated with semen from a boar AGPIC-337 TG ELITE. The selected sows to participate in the experiment have not subjected to farrowing synchronization with the oxytocin. At the time of farrow, males and females were randomly separated.

In the nursery, piglets were housed in collective pens with suspended plastic floor, with a space of 0.4 m² per animal. Two pens of 12 piglets were used in the experiment. Heating was provided by infrared lamps, controlled by a thermostat, with automatic shutdown when the temperature reached 34 °C, and restart when it reached 30 °C.

The early weaned animals were fed with a common composition described in Table 1.

Table 1. Description of elements in substitute A and B

Element	Substitute A (kg)	Substitute B (kg)
Crude Protein	Minimal 18 %; Maximum 22 %	Minimal 18 %; Maximum 24 %
Raw fat	Minimal 9,35 %; Maximum 12,65 %	Minimal 12 %; maximum 18 %
Lysine	Minimal 15,03 g; Maximum 18,4 g	Minimal 10 g; Maximum 25 g
Methionine	Minimal 5,4 g; Maximum 6,7 g	Minimal 2 g; Maximum 9 g
Ethereal Extract	Minimal 100 g	Minimal 131 g
Raw Fiber	Maximum 25 g	Maximum 19,6 g
Mineral Matter	Maximum 100 g	Maximum 70 g
Moisture	Maximum 75 g	Maximum 40 g
Calcium	Minimal 4,6 g; Maximum 8,6 g	Minimal 3 g; Maximum 10 g
Phosphorous	Minimal 3,2 g; Maximum 7,2 g	Minimal 2 g; Maximum 9 g
Sodium	Minimal 1,2 g; Maximum 5,2 g	Minimal 2 g; maximum 8 g

Iron	Minimal 140 mg; Maximum 160 mg	Minimal 90 mg; Maximum 110 mg
Copper	Minimal 150 mg; Maximum 170 mg	Minimal 150 mg; Maximum 170 mg
Zinc	Minimal 80 mg; Maximum 120 mg	Minimal 80 mg; Maximum 120 mg
Manganese	Minimal 35 mg; Maximum 55 mg	Minimal 40 mg; Maximum 60 mg
Iodine	Minimal 1 mg; Maximum 1,4 mg	Minimal 0,3 mg; Maximum 1 mg
Selenium	Minimal 0,2 mg; Maximum 0,4 mg	Minimal 0,2 mg; Maximum 0,4 mg
Vitamin A	Minimal 14400 UI; Maximum 17600 UI	Minimal 20000 UI; Maximum 30000 UI
Vitamin D3	Minimal 1800 UI; Maximum 2200 UI	Minimal 3000 UI; Maximum 5000 UI
Vitamin E	Minimal 140 UI; 210 UI	Minimal 100 UI; Maximum 200 UI
Citric acid	Minimal 300 mg; Maximum 900 mg	Minimal 18000 mg; Maximum 22000 mg
Fumaric acid	Minimal 4000 mg; Maximum 6000 mg	-
Phytasee	Minimal 400 FTU; Maximum 600 FTU	-

From 10 to 13 days, the piglets were fed with substitute A and B, diluted in water in the proportion of 2.5 liters of water for 1.0 kg of substitute, supplied *ad libitum* in polychloride troughs vinyl, with mouths for 10 animals. From 14 to 17 days, were diluted in water at the rate of 2.2 liters of water for 1.0 kg of the mixture. From 18 to 21 days, only pre-turbo was fed in dry form in funnel-type troughs with feed wetting valves. Water was freely available in pacifier drinkers and auxiliary troughs. Information on the supply of substitutes is represented in Table 2.

Table 2. Supply of milk substitutes

Period (days of life)	Substitute A	Substitute B	Pre-turbo feed
10 to 13 days	900 g	100 g	0 g
14 to 17 days	900 g	0 g	100 g

18 to 21 days

0 g

0 g

ad libitum

The experimental design was randomized blocks with 24 replications of each treatment. The treatments were early weaning at 10 days with the use of milk replacer (treatment), and a conventional weaning at 21 days used on the farm (control). In each block, 12 piglets of four sows were used, totalizing 48 animals. Therefore, in six blocks, 288 animals were used in total.

At 10 days of age, half of the litter of each sow, that is, 6 animals were separated to the nursery, and the rest were kept with the mother. In the nursery, 12 piglets were housed in each pen, that is, two pens of animals in the experiment, totaling 24 animals. Six piglets from other sows were placed in the farrowing cage. In this way, the two treatments kept the same number of animals up to 21 days, both in the nursery and in the maternity hospital.

At birth, all piglets were individually weighed with a B-MAX® digital scale and received an ear tattoo with their respective number within the experiment. Piglets weighing between 1,000 kg and 1,800 kg were selected, approximately half female and half male. At 10 days of age, individual piglets were weighed again using the same scale.

At 21 days of age, the weight of the animals that were designed for the daycare facilities was measured. At that moment, the ear tags were placed according to the tattoo number for better identification of the animals. Upon leaving the day care center, at 66 days of age, all animals were individually weighed. At the end of finishing phase, at 163 days of age, the animals were weighed again. In all rearing phases, the weight gain of all animals was measured.

The carcass yield analyzes were carried out in a located in the Patos de Minas city in the state of Minas Gerais, and the geographic coordinates of the slaughterhouse are latitude 18°37'11" and longitude 46°30'47". Hot carcass weight, backfat thickness, muscle thickness and percentage of lean meat were measured using the Hennessey® pistol, and in sequence, the carcasses were stored in a cold room.

After performing the variance normality and homoscedasticity test, the data were submitted to analysis of variance, and the means were compared by the Scott-Knott test of multiple comparisons, with a significance level of 5%. The analyzes will be carried out in the statistical program Action version 2.8.

Results and discussion

The averages of the live weight at 10 days, and weight gains from each final rearing stage in the carcass weight stages for the studies studied are summarized in Tables 3, 4 and 5.

Table 3. Average weights of animals

Variable	Control	Treatment	p value
Birth weight (kg)	1,42 ^a	1,43 ^a	0,537
Weight at 10 days (kg)	3,52 ^a	3,51 ^a	0,791
Weight at 21 days (kg)	6,42 ^a	4,72 ^b	0,000
Weight at 66 days (kg)	25,88 ^a	23,13 ^b	0,000
Weight at 163 days (kg)	125,53 ^a	119,43 ^b	0,000

The means followed by the same letter do not differ from each other by the Scott-Knott test, with a 5% probability

Table 4. Averages of animal weight gains

Variable	Control	Treatment	p value
Birth to 10 days (kg)	2,10 ^a	2,07 ^a	0,580
From 10 days to 21 days (kg)	2,89 ^a	1,21 ^b	0,000
From 21 days to 66 days (kg)	19,45 ^a	18,40 ^b	0,002
From 66 days to 163 days (kg)	99,65 ^a	96,29 ^b	0,005

The means followed by the same letter do not differ from each other by the Scott-Knott test, with a 5% probability

Table 5. Means of slaughterhouse data

Variable	Control	Treatment	p value
Muscle depth (mm)	69,37 ^a	67,49 ^b	0,005
Backfat thickness (mm)	11,32 ^a	11,06 ^a	0,387
Lean meat percentage (%)	60,54 ^a	60,43 ^a	0,623
Carcass weight (kg)	92,17 ^a	87,91 ^b	0,000

The means followed by the same letter do not differ from each other by the Scott-Knott test, with a 5% probability

Early weaning is an alternative that seeks to solve the problem of the birth of many piglets, which is incompatible with the number of teats, and mainly with the milk production of the sow. Additionally, the practice of weaning is a moment that causes great impact for piglets, leading to physiological, structural and functional changes in the entire organism. Although there is no consensus on which model best represents the age-related behavior of weight gain in pigs, it is known that the growth rate is higher in the first days of the animal's life (Schinckel et al., 2004). Thus, incorrect handling in the first days of life can impair the animal's performance.

At weaning there are stressors such as separation from the breeder, change of environment, difficulty in adapting to feeders and drinkers, and social and diet change, which lead to a decrease the immunity, intestinal changes and reduced feed intake, consequently affecting the growth rate and animal performance (Xu et al., 2015).

In the intensive swine production system, piglets can be weaned at one or two weeks of age, and consequently, an amplification of the physiological and behavioral effects of weaning occurs (McLamb et al., 2013; Li et al., 2017). All of these stressors can increase cortisol concentration.

Weary et al. (1999) evaluating weaning at 14 and 28 days of age, reported that piglets weaned at 14 days performed more stereotypical behaviors, resulting from stress, compared to those weaned at 28 days of age. Therefore, the authors concluded that the later the weaning, lower the stress for the piglets.

The increase in cortisol induces an increase in the production of free radicals, which causes oxidative damage to proteins, as well as lipid peroxidation, which can lead to cytotoxicity and cell damage (Szabo, 2003).

In the first 24 hours after weaning, functional and structural changes occur in the small intestine, which include a decrease in villus height and a reduction in the specific activity of digestive and absorptive enzymes in piglets (Hall and Byrne, 1989). Furthermore, among the physiological and gastrointestinal factors impacted by the weaning transition, disruption of the microbiota is likely to occur, being recognized as one of the keys that lead to post-weaning diarrhea (Isaacson and Kim, 2012). As a result, the animal reduces productive performance and weight gain.

All the aforementioned metabolic and behavioral changes corroborate the results presented in this study, as piglets early weaned presented greater challenges in terms of survival and weight gain early in life, affecting body growth, compromising productive performance throughout the entire life cycle.

Another important aspect is that the weight at weaning has a direct influence on the weight at daycare and finishing. The higher weaning weight generates a positive and lasting effect for the subsequent phases, showing a positive correlation with the final finishing weight (Faccin et al., 2020). In the present study, weaning at 10 days impaired the performance of piglets in the nursery and finishing phases. Piglets weaned at 21 days show greater growth potential, so maximizing weaning weight is a key point in swine production.

Ko et al. (2015) concluded that age and weaning weight also influence carcass characteristics. In the present study, the Hennessey® equipment was used to measure muscle depth and backfat thickness, and with the values found, lean meat percentage calculations are performed through prediction equations programmed in the system itself. The percentage of lean meat is directly influenced by muscle depth, backfat thickness and hot carcass weight.

The low weight of piglets weaned at 10 days of age was negatively correlated with hot carcass weight and muscle depth but did not affect carcass lipid deposition and lean meat percentage. According to Favero and Guidoni (2001), the backfat thickness contributes 80% to the prediction of the percentage of meat in the carcass. Therefore, the results of the present study corroborate the authors mentioned above, there was no difference between the groups in relation to the backfat thickness, and consequently, there was no difference in the percentage of lean meat.

Conclusion

Pigs weaned early have a lower performance compared to piglets weaned at 21 days. Therefore, other alternatives are necessary for sows that produce piglets in excess, such as genetic improvement and increase in the amount of milk and greater number of sows' teats, in addition to suckling techniques, such as induction of milk production and lowering.

Acknowledgements

This study was supported by Cinco Estrelas Farm; Pig Farmers Cooperative LTDA (SUINCO); and Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES).

We are also grateful to the Graduate Program at the Federal University of Uberlândia.

References

- Bruns C., Noel R., McNeil B., Sonderman J., and Rathje T. 2018. Examining factors that influence pig quality measured by weaning weight. *J. of Anim. Sci.* 96: 62–63.
- Faccin J.E.G., Laskoski F., Quirino M. et al. 2020. Impact of housing nursery pigs according to body weight on the onset of feed intake, aggressive behavior, and growth performance. *Tropical Animal Health and Production.* 52: 1073–1079. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02096-6>.
- Fávero J.A.; Guidoni A.L. 2001. Normatization and standardization of typification of pig carcasses in Brazil – positive and restrictive aspects. In: *Virtual International Conference on Pork Quality*, 2: 73-79.
- Hall G.A., and Byrne T.F. 1989. Effects of age and diet on small intestinal structure and function in gnotobiotic piglets. *Res. in Veterinary Sci.* 47: 3020-3024.
- Isaacson, R., and Kim H.B. 2012. The intestinal microbiome of the pig. *Anim. Health Res. Reviews.* 13: 100–109.
- Ko K.B., Kim G.D., Kang D.G., Kim Y.H., Yang I.D., and Ryu Y.C. 2015. The influences of weaning age and weight on carcass traits and meat quality of pigs. *J. of Anim. Sci.* 86:428-434.
- Li K., Xiao Y., Chen J., Chen J., He X., and Yang H. 2017. Microbial compositions in different gut locations of weaning piglets receiving antibiotics. *Asian-Australas. J. of Anim. Sci.* 30: 78–84.
- McLamb B.L., Gibson A.J., Overman E.L., Stahl C., and Moeser A.J. 2013. Early weaning stress in pigs impairs innate mucosal immune responses to enterotoxigenic *E. coli* challenge and exacerbates intestinal injury and clinical disease. *Plos One.* 8: e59838. [doi:10.1371/journal.pone.0059838](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059838).
- Schinckel A.P., Ferrel J.P., Einstein M.E., Pearce S.M., and Boyd R.D. 2004. Analysis of pig growth from birth to sixty days of age. *The Prof. Anim. Sci.* 20: 79–86.

Strathe A.V., Bruun T.S., and Hansen C.F. 2017. Sows with high milk production had both a high feed intake and high body mobilization. *Anim.* 11: 1913–1921.

Szabo C. 2003. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol. Letters.* 140-141: 105-112.

Xu L., Cao Y., Yin J., Zhang H., and Wang C. 2015. Research on destructive heating test of high moisture corn stored in constant temperature. *China J. Grain Process.* 40: 54–55.

Weary D.M., Appleby M.C., and Fraser D. 1999. Responses of piglets to early separation from the sow. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 63: 289–300.

**CAPÍTULO IV – ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROENDÓCRINAS
DE LEITÕES DESMAMADOS PRECOCEMENTE**

(Artigo a ser submetido na revista Plos One)

Normas da revista: <https://journals.plos.org/plosone/s/submission-guidelines>

Alterações comportamentais e neuroendócrinas de leitões desmamados precocemente

Stenia Severo Rabelo¹, Robson Carlos Antunes¹, et al.

1 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Departamento e Universidade Federal de Uberlândia-MG, Brasil,

Resumo

A hiperprolificidade da fêmea suína ocasionou a produção de leitegadas numerosas, e com isso, surgiram alguns desafios na fase de lactação, na qual a exigência da fêmea é maior do que sua capacidade fisiológica. Diante disso, o manejo de um desmame antecipado é praticado em granjas comerciais. O desmame precoce e privação dos cuidados maternos é considerado um evento estressante que pode aumentar a sensibilidade ao estresse na vida adulta do animal. Sendo assim, são necessários estudos comportamentais e de bem-estar animal para avaliar a viabilidade desta prática. No presente estudo, foram investigados o desmame aos 10 (precoce) e aos 21 dias de idade, e analisadas as lesões corporais próximas aos 10 dias de idade dos animais, teste do campo aberto e objeto novo, tempo de embarque dos animais da granja para o frigorífico, o perfil epigenético do gene *NR3C1* do DNA e expressão dos genes *NR3C1*, *NR3C2*, *FKBP5*, *HTR1A* e *BDNF*, comparando gêneros e tratamentos. Os leitões desmamados precocemente mostraram inibição comportamental com vocalizações reduzidas no teste do campo aberto, e maior proximidade e interação com o objeto em comparação com leitões desmamados aos 21 dias. Sobre o padrão de metilação do DNA do gene *NR3C1*, não houve diferença entre os grupos, e isto pode ser explicado pelos cuidados maternos até os 10 dias de idade serem suficientes para não provocar alterações epigenéticas no hipocampo. Quanto à expressão de RNAm de genes relacionados ao estresse, não houve diferença significativa entre os grupos. As respostas comportamentais do desmame precoce podem representar uma adaptação, sendo necessários mais estudos para correlacionar alterações epigenéticas e de expressão gênica relacionadas ao comportamento animal.

Introdução

O desmame precoce é uma alternativa para a produção de leitões supranumerários decorrentes de um genótipo da fêmea suína hiperprolífica. Apesar de ser um manejo usualmente realizado nas granjas comerciais para evitar um maior desgaste da matriz suína, a mudança da dependência do leite da fêmea para a dependência de outros alimentos, pode prejudicar o crescimento da prole [1]. Portanto, o desmame precoce é um desafio para a criação de leitões, uma vez que necessita de novas estratégias de criação de leitões, como a utilização de substitutos de leite. Adicionalmente, devido à ausência da mãe no início da vida do leitão, podem ser observadas alterações comportamentais e neuroendócrinas.

A privação da relação entre a mãe e o filhote pode ser traumática e estressante em mamíferos com estudos comprovados em bovinos [2], ratos [3, 4] e camundongos [5, 6]. A separação entre a mãe e o filho é um exemplo de estresse do início da vida com consequências duradouras [7, 8]. Com isso, os animais desmamados precocemente, que apresentam um estresse no início da vida, alteram o desenvolvimento neuronal e de comportamento, pois aumentam a memória para reflexos condicionados adquiridos na vida [9].

Usualmente, as idades de desmame aplicadas em granjas comerciais são menores do que o desmame natural em suínos, que ocorre entre 56 e 119 dias [10]. Portanto, o desmame precoce resulta em comportamento agudo e sinais fisiológicos de estresse durante os primeiros dias [11, 12]. Ademais, Yuan et al. 2004 relatou que eventos estressantes no início da vida ocasiona um aumento na agressividade dos animais [13].

Eventos ambientais ocorridos nos primeiros dias de vida estão relacionadas com alterações epigenéticas [15, 16]. Perfis epigenéticos podem ser influenciados por fatores ambientais tais como dieta, ambientes sociais e estresse [17]. Portanto, o desmame precoce e ausência dos cuidados maternos pode ser um ativador de alterações epigenéticas na prole, no sentido de ser determinante na sua sobrevivência. A ausência da mãe influencia no

desenvolvimento dos sistemas neurais subjacentes a respostas ao estresse, do ponto de vista comportamental e endócrino.

O hipocampo, que compõe parte do sistema límbico, possui grande densidade de receptores de glicocorticoides (GR), que, quando ativados, inibem a atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal, limitando a resposta ao estresse. Sendo assim, um aumento expressivo do cortisol provoca uma regulação negativa aguda de GR do hipocampo [14]. Em estudos sobre o descuido materno em ratos, filhotes que tiveram mães com baixas taxas de cuidado apresentaram alterações epigenéticas como a metilação do DNA no gene *NR3C1* [18, 19]. Com a presença do grupo metil no DNA, o acesso ao mesmo para o processo de transcrição a partir do RNA é reduzido e assim, ocorre um silenciamento do gene *NR3C1*, regulador da produção de GR.

Segundo Weaver et al. 2004 [18], o baixo cuidado materno resultou em um aumento da metilação no local de ligação da proteína induzida pelo fator de crescimento do nervo I (NGFI-A), localizado no gene do GR do hipocampo (*NR3C1*), levando à diminuição da expressão de *NR3C1*. Outros estudos demonstraram que filhotes com maior cuidado materno, aumenta a expressão do receptor de glicocorticoide (GR) no hipocampo, aumento da sensibilidade de *feedback* de glicocorticoides, e diminui a expressão do fator de liberação de corticotrofina hipotalâmica (CRF) e respostas mais modestas do estresse do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) em comparação com animais com baixo cuidado materno [20, 21].

Com isso, objetivou-se investigar o desmame aos 10 dias de idade em suínos e os efeitos a curto e longo prazo no comportamento animal e alterações neuroendócrinas. Este estudo das alterações de comportamento e neuroendócrinas em suínos visa fornecer base científica relevante para mensurar a aceitabilidade da prática do desmame precoce, em termos de bem-estar animal.

Material e métodos

Declaração ética

A realização dos procedimentos experimentais foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, processo de número 072/19.

Delineamento experimental e manejo dos animais

O delineamento do experimento foi em seis blocos casualizados com 24 repetições de cada tratamento. Os tratamentos foram desmame precoce aos dez dias com utilização de sucedâneo de leite (tratamento), e o desmame convencional utilizado na granja, aos 21 dias (controle). A cada bloco, foram utilizados 12 leitões de quatro fêmeas suínas, totalizando 48 animais. Portanto, em seis blocos, foram utilizados 288 animais no total.

O experimento foi conduzido em uma granja comercial de ciclo completo, com um plantel de aproximadamente 500 matrizes, localizada no município de Patrocínio-MG. Foram utilizados leitões oriundos de 24 fêmeas com cruzamento Large White x Landrace da linhagem DB-90 de 2° a 6° ordem de parto. As fêmeas foram inseminadas com sêmen proveniente de diferentes machos AGPIC-337 TG ELITE. No momento do parto, não foi realizada a indução com ocitocina.

Ao nascimento, 12 leitões da mesma mãe foram selecionados aleatoriamente, sendo que seis leitões, divididos de forma controlada em machos e fêmeas, constituíram cada tratamento. Todos os leitões do experimento permaneceram com suas mães até os 10 dias de idade. Aos 10 dias, metade dos leitões foram para o berçário, e o restante ficou com a mãe. No berçário, 12 leitões foram alojados em cada baia coletiva. Foram colocados na gaiola de maternidade seis leitões provenientes de outras fêmeas. Desta forma, os dois tratamentos permaneceram com a mesma quantidade de animais até 21 dias, tanto no berçário, quanto na maternidade.

No berçário, os animais do estudo foram alojados em baias coletivas de 12 animais. O aquecimento dos leitões foi feito por lâmpadas infravermelho, com temperatura controlada por termostato, com desligamento automático quando atingia 34 °C, e religamento quando atingia 30 °C. Os animais desmamados precocemente foram alimentados com sucedâneos comerciais usuais da granja e a partir dos 21 dias de idade, os animais dos dois grupos experimentais tiveram o mesmo manejo nas fases de creche, crescimento e terminação.

Análise comportamental

As análises de comportamento do experimento foram: 1) Análise de lesões corporais no dia 10 do desmame precoce, 24 horas, 48 horas, e após 4 dias após o desmame precoce; 2) Teste do campo aberto aos 21 dias; 3) Teste do objeto novo aos 21 dias; 4) Tempo de embarque dos animais da granja para o transporte até o frigorífico. A análise das lesões corporais foi realizada em todos os 288 leitões. O teste do campo aberto e objeto novo foram realizados aleatoriamente em 20 leitões de cada bloco, totalizando medidas coletadas de 120 leitões, e o tempo de embarque foi realizado em grupos de animais do experimento.

O escore de lesões corporais para avaliar a agressividade dos leitões foi realizada através de uma câmera com 12 megapixels e lente de grande abertura f/1.7 com 1/2.5 de tamanho, realizadas no dia do desmame aos 10 dias, 24 horas, 48 horas, e 4 dias após o desmame. As análises foram realizadas por um mesmo avaliador. Foram realizadas um total de seis fotografias dos 288 leitões, com a vista lateral direita do corpo, parte externa e interna da orelha e face direita, parte externa e interna da orelha e face esquerda, e lateral esquerda do corpo do animal. Em seguida, as lesões foram contadas, e após o primeiro dia de contagem, eram contadas apenas as novas lesões, de acordo com a vermelhidão e aspecto de lesão recente.

O teste do campo aberto e objeto novo foram realizados no mesmo momento, aos 21 dias de idade, utilizando uma câmera com 12 megapixels e lente de grande abertura f/1.7 com

1/2.5 de tamanho. O teste do campo aberto foi realizado em 20 leitões escolhidos aleatoriamente, sendo dez de cada tratamento, nos 6 blocos do experimento, utilizando a metodologia de Puppe et al. 2007 [22]. Foram feitas gravações de cinco minutos de cada leitão, e a área utilizada para o teste foram baias da creche da granja em estudo, com dimensão de 6 m², e piso de plástico, 40 cm x 50 cm. Foram cobertos cochos presentes nas salas da creche da granja, para não desviar atenção dos leitões. Após realizada as gravações, a permanência do animal no centro e lateral da baia, medidos em segundos, e quantidade de vocalização dos animais foram analisados.

Após os cinco minutos de gravação do teste do campo aberto, o teste do objeto novo foi realizado, com a inclusão de um cone de sinalização cônico, de cor alaranjada e de tamanho de 50 cm, no centro da baia. A mesma câmera do teste do campo aberto foi utilizada. A análise foi feita pela quantidade de vocalizações do animal, a latência para interação com o cone, tempo de interação e exploração com o objeto, e o tempo que o animal ficou próximo do objeto. A latência, interação e proximidade do objeto foram medidas em segundos.

O tempo de embarque foi realizado quando os animais apresentavam 163 dias de idade dos animais por meio da mensuração do tempo gasto, em segundos, desde a chegada do primeiro animal no corredor da granja, até a entrada do último animal no caminhão de transporte. A mensuração foi realizada em grupos de 5 ou 6 animais, do mesmo tratamento. A passagem dos animais pelos corredores da granja, até a chegada ao caminhão, foi realizada de forma calma e tranquila, sem agressividade, gritos e reações bruscas direcionadas aos suínos.

Para análise estatística das variáveis comportamentais do presente estudo, inicialmente foi verificada as pressuposições da análise de variância. Os dados que não atenderam às pressuposições, foram transformados em raiz quadrada para realizar a análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott, com nível de significância de 5%. As análises

foram realizadas no programa estatístico Action® [23], versão 2.8, anexado ao programa Microsoft Excel.

Coleta de material para análise epigenética e de expressão gênica

O material biológico escolhido para análise epigenética e de expressão gênica foi o hipocampo. O abate dos animais foi realizado na Cooperativa de Suinocultores LTDA (SUINCO), localizada no município de Patos de Minas-MG. Todas as normas do Regulamento de Inspeção Industrial dos Produtos com Origem Animal (RIISPOA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) foram seguidas. A coleta das amostras do hipocampo foi realizada em 12 animais de cada bloco, divididos de forma aleatória entre machos e fêmeas.

A coleta do hipocampo foi realizada durante o fluxograma normal de abate, após a serragem da cabeça dos animais. Todo o conteúdo encéfalo do animal foi coletado, e imediatamente separado em hipocampo e restante do sistema nervoso central, com auxílio de bisturi e pinça, em um laboratório acoplado à linha de abate. Após a separação do hipocampo, as amostras foram colocadas em tubos criogênicos de 2 mL com rosca externa (Start BioScience®), estéril e armazenadas a -196 °C em nitrogênio líquido. Após o término do experimento, todas as amostras foram transportadas até a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), e armazenadas em freezer a -80 °C, onde foi realizada a análise das alterações epigenéticas e de expressão gênica.

Análise da metilação do DNA

Para a análise da metilação de DNA, utilizou-se um delineamento em esquema fatorial 2x2, gênero x tratamento (macho x fêmea; desmame aos 10 dias x convencional). Foram

analisadas amostras de três blocos, sendo então avaliados três machos controle, três machos tratamentos, três fêmeas controle e três fêmeas tratamento.

Inicialmente foi realizada a extração do DNA pelo método descrito em Biase et al. [24]. A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese de gel de agarose e a quantidade das amostras foi analisada em espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As amostras de DNA foram armazenadas a -20 °C.

Os *primers* foram desenhados pelo site *UCSC Genome Browser* e *Primer Seeker Zymo*. Foram utilizadas duas sequências de *primers* (nested PCR, *inner* e *outer*), que foram utilizadas para flanquear e amplificar as 48 ilhas de Citosina-fosfato-Guanina (CpG) no *outer*, e 39 ilhas CpG no *inner*. As sequências dos *primers* estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* para análise de metilação do DNA

PCR OUTER				
Gene	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Número de acesso	Sítio CpG	<i>Amplicon</i> (pb)
<i>NR3C1</i>	F: GATTTTTTYYGGGTTTAGAGTA R: CTAATCTTTCTAAACRAACTCC	NM_001008481	48	396
PCR INNER				
Gene	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Número de acesso	Sítio CpG	<i>Amplicon</i> (pb)
<i>NR3C1</i>	F: GTTTGGTTTTTTAGTTTYGTAAG R: AAAAACCRAATTTCTCTAATTTCTC	NM_001008481	39	301

F: *forward*; R: *reverse*; bp: par de bases

Após a extração do DNA, foi realizado o tratamento com bissulfito de sódio, que converte as citosinas não metiladas em uracilas, ou timinas após o PCR, e as citosinas metiladas permanecem como citosinas. Para realizar o tratamento do DNA com bissulfito de sódio foi utilizado o kit EZ DNA Methylation-Lightning® (Zymo Research, Orange, CA, USA), seguindo as instruções recomendadas do fabricante. O DNA extraído e quantificado foi diluído para atingir a concentração recomendada no kit de 500 ng de DNA. Ao final do processo, as

amostras foram armazenadas em microtubos na temperatura de -80 °C, até realizar a amplificação por PCR.

Para avaliar o DNA tratado com bissulfito de sódio, foi realizado o sequenciamento do tipo Sanger ou sequenciamento bissulfito, através da clonagem do produto de PCR para analisar a molécula de forma individual e específica. Após a realização do desenho dos *primers* mencionado anteriormente, foi realizada a diluição dos *primers* (*outer* e *inner*) e preparação da solução estoque (100 pmol/μL de *forward* e *reverse*) e solução de trabalho (10 pmol/μL de *forward* e *reverse*).

O protocolo seguido para a reação de PCR *outer* foi realizado com um volume total de 20 μL, compreendendo 1x tampão Taq, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 1 U Platinum™ Taq polimerase (Invitrogen, CA, EUA), 10 pmol de *primer* (*forward* + *reverse*) e 3 μL de DNA tratado com bissulfito. A diferença do protocolo de PCR *outer* e *inner*, foi que no *inner* foi utilizado apenas 1 μL de DNA tratado com bissulfito.

As etapas no termociclador para PCR *outer* foram: etapa de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 51,8 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, com extensão final a 72 °C por 15 min. As etapas no termociclador para PCR *inner* foram: etapa de desnaturação a 94 °C por 4 minutos, seguido de 29 ciclos a 94 °C por 40 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto, com extensão final a 72 °C por 15 min.

Após a PCR, *amplicons* de DNA foram purificados a partir da eletroforese de gel de agarose. Esse procedimento é realizado apenas no PCR *inner*. Após a eletroforese, foi realizado o corte das bandas marcadas no gel de agarose para purificação através do protocolo descrito no kit The Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (US Promega Corporation, Madison, WI, USA). Após a purificação, os *amplicons* foram ligados em vetor seguindo as instruções do kit TOPO TA Cloning vector (pCRII-TOPO® vector system, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Em seguida, foram clonados em bactérias DH5α utilizando um protocolo de choque térmico.

Em seguida, o DNA plasmidial foi isolado utilizando o kit Pure Yield Plasmid Miniprep System® (US Promega Corporation, Madison, WI, USA). Após a realização do protocolo de Miniprep, as amostras mantidas no gelo, foram quantificadas no espectrofotômetro. Após a realização de todos os protocolos, foi feito o sequenciamento Sanger ou sequenciamento bissulfito, e o resultado foi analisado através do site *Quantification tool for Methylation Analysis* (QUMA).

Os dados sobre a metilação do DNA do gene *NR3C1* foram comparados entre grupos experimentais usando o teste de Mann-Whitney, e a comparação de citosina entre os grupos foi realizada pelo teste de Fisher. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão da média dos grupos experimentais. Um valor de $p \leq 0,05$ denota diferença significativa.

RT-qPCR

A expressão gênica foi realizada através das amostras do hipocampo, em esquema fatorial com dois fatores (fator 1: gênero-tratamento com 4 níveis; fator 2: gene com 5 níveis), totalizando $4 \times 5 = 20$ tratamentos. Foram realizadas cinco repetições biológicas (cinco placas) e três réplicas da técnica.

As extrações de RNAs das amostras do hipocampo de suínos foram realizadas através do kit PureLink™ RNA mini (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), e o procedimento foi realizado conforme as instruções do fabricante. O tecido de aproximadamente 200 mg foi macerado com nitrogênio líquido em um cadinho, e em seguida foi realizada a mistura do tecido macerado com solução trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), que é um reagente para o isolamento simultâneo de RNA. Para cada 50 a 100 mg de amostra, foi adicionado 1 mL de trizol. Após a lise do RNA com trizol, foi realizada a ligação do RNA à membrana e lavagem do material extraído. Após a lavagem, foi realizada a eluição com água

RNase-free, quantificação no espectrofotômetro (NanoDrop®). As amostras foram armazenadas a -80 °C.

Após a extração, 5 µg de RNA foi tratado com 5U da enzima DNase I, e incubados a 37 °C por 30 minutos, seguido de 75 °C por 10 minutos. Após esse processo, foi realizada a purificação do RNA tratado com o kit RNeasy Plus Micro kit (Qiagen Samples e Assay Technologies®). Para realizar a síntese de cDNA, o kit GoScript Reverse Transcriptase foi utilizado (US Promega® Corporation, Madison, WI, USA). Todos os procedimentos foram seguidos de acordo com a descrição do fabricante.

Por fim, para a realização do qPCR, foi utilizado o kit GoTaq qPCR Master Mix (US Promega® Corporation, Madison, WI, USA). O procedimento foi realizado na máquina de RT-qPCR: 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®). Para a reação, foram utilizados GoTaq (12,5 µL por reação), água nuclease-free (8,8 µL), e os *primers* (200nM/cada, 1,0 µL). Em volume final de 25 µL, a condição do PCR foi: 95 °C por 5 min, seguido de 50 ciclos de: desnaturação a 95 °C/15 s, anelamento e extensão a 60 °C/1 min.

No experimento, foram realizadas cinco placas no total, e três repetições de cada grupo (macho controle, fêmea controle, macho tratamento, fêmea tratamento) de cada gene. Os genes analisados foram: 1) *NR3C1* (codificador de receptores de glicocorticoides), 2) *NR3C2* (codificador de receptores de mineralocorticoides), 3) *FKBP5* (codificador de uma CO-chaperona, envolvida com a sensibilidade dos GR ao cortisol), 4) *HTR1A* (codificador de receptores serotoninérgicos 5HT-1a), 5) *BDNF* (codificador do fator neurotrófico derivado do encéfalo).

Para controle do qPCR, dois genes endógenos, GAPDH e β -actina foram utilizados. A curva de eficiência dos *primers* foi realizada com cinco pontos e fator de diluição 1:4, realizado em triplicata. A eficiência dos *primers* foram entre 90% e 100%. Os níveis de RNAm foram normalizados usando a média geométrica dos genes endógenos β -actina e GAPDH, e a

quantificação relativa foi calculada pelo método $\Delta\Delta C_t$, com correção de eficiência segundo [25]. As especificações dos *primers* utilizados no experimento estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Sequências dos *primers* para amplificação de RNAm por RT-qPCR

Gene	Direção do <i>primer</i>	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Número de acesso ao GenBank	<i>Amplicon</i> (bp)
<i>NR3C1</i>	<i>Forward</i>	AGTTCCCAAGGACGGTTTGAA	NM_001008481.1	108
	<i>Reverse</i>	TGACTGGAGTTTCCTTCCCTC		
<i>NR3C2</i>	<i>Forward</i>	ATCTGCTCTCCACCCTAAAC	NC_010450.4	191
	<i>Reverse</i>	GAGAAACTGGCTGTTCGTATG		
<i>FKBP5</i>	<i>Forward</i>	GAAGGAGCGACCGTAGAAATC	NM_001315611.1	139
	<i>Reverse</i>	GCATCTTCTCCAGGGCTTTATC		
<i>HTR1A</i>	<i>Forward</i>	CAGAACGTGGCGAACTATCT	XM_005672476.3	113
	<i>Reverse</i>	CCCAGAGTCCACTTGTTGAG		
<i>BDNF</i>	<i>Forward</i>	GACTCTGGAGAGCGTGAATG	NM_214259.2	162
	<i>Reverse</i>	TACATGTCCGCGTCCTTATTG		
GAPDH (controle)	<i>Forward</i>	GTCTGGAGAAACCTGCCAAATA	AF017079.1	152
	<i>Reverse</i>	CCCAGCATCAAAGGTAGAAGAG		
β -actin (controle)	<i>Forward</i>	GACCACCTTCAACTCGATCAT	U07786.1	124
	<i>Reverse</i>	GATCTCCTTCTGCATCCTGTC		

bp: par de bases

As comparações de expressão entre os tratamentos foram realizadas por meio da análise de variância e teste de Tukey (dados paramétricos) ou Kruskal Wallis e Mann Whitney (dados não-paramétricos). As análises estatísticas sobre a expressão gênica foram realizadas pelo programa raphPad Prism versão 7.00 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA, www.graphpad.com).

Resultados

Análise comportamental

O escore das lesões corporais dos animais estão representados na Tabela 3. Houve diferença significativa entre os grupos experimentais às 24 e 48 horas após o desmame, sendo que o tratamento obteve maior número de lesões se comparado com o grupo controle.

Tabela 3. Médias do número de lesões em diferentes dias próximo ao desmame

Variável	Controle	Tratamento	p-valor
No dia do desmame aos 10 dias	1,60 a	1,19 a	0,08
24 horas após o desmame *	2,33 b	5,68 a	0,00
48 horas após o desmame *	2,49 b	6,32 a	0,00
4 dias após o desmame *	5,46 a	6,47 a	0,27

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, com 5% de probabilidade

*Transformação de dados para atender às pressuposições da ANOVA (raiz quadrada)

Os resultados dos testes de campo aberto e objeto estão representados na Tabela 4 a seguir. No teste do campo aberto, houve diferença significativa na vocalização, sendo que os animais do grupo controle obtiveram um maior resultado se comparado com a tratamento. No teste do objeto novo, houve diferença significativa no que se refere à latência, proximidade e interação com o objeto, sendo que os leitões do grupo controle tiveram maior latência para se aproximar do objeto, e os animais do desmame aos 21 dias de idade tiveram maior proximidade e interação com o objeto.

Tabela 4. Teste do campo aberto e objeto novo aos 21 dias de idade

Campo aberto			
Variável	Controle	Tratamento	p-valor
Vocalização (frequência)	200,65 a	176,86 b	0,01
No centro do campo (segundos) *	39,43 a	35,23 a	0,22
Na lateral do campo (segundos)	260,56 a	264,76 a	0,30
Objeto Novo			
Variável	Controle	Tratamento	p-valor
Vocalização (frequência) *	175,56 a	173,35 a	0,61
Latência (segundos)	271,56 a	257,95 b	<0,001
Próximo ao objeto (segundos)*	19,68 b	27,45 a	0,01
Interação com o objeto (segundos) *	8,75 b	14,60 a	0,00

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, com 5% de probabilidade

*Transformação de dados para atender às pressuposições da ANOVA (Raiz quadrada)

Para a variável do tempo de embarque, não houve diferença entre os grupos experimentais (Tabela 5).

Tabela 5. Tempo de embarque dos animais para o transporte até o frigorífico

Grupos	Tempo (segundos)	p-valor
Controle	170,04 a	0,122
Tratamento	153,29 a	

As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott, com 5% de probabilidade

*Transformação de dados para atender às pressuposições da ANOVA (Raiz quadrada)

Análise de metilação do DNA

A metilação de cada grupo experimental (macho controle, macho tratamento, fêmea controle, fêmea tratamento) está representada na Figura 1. A figura referida demonstra a porcentagem de metilação de cada grupo e o desvio padrão. Todos os grupos experimentais apresentaram padrão de metilação semelhante.

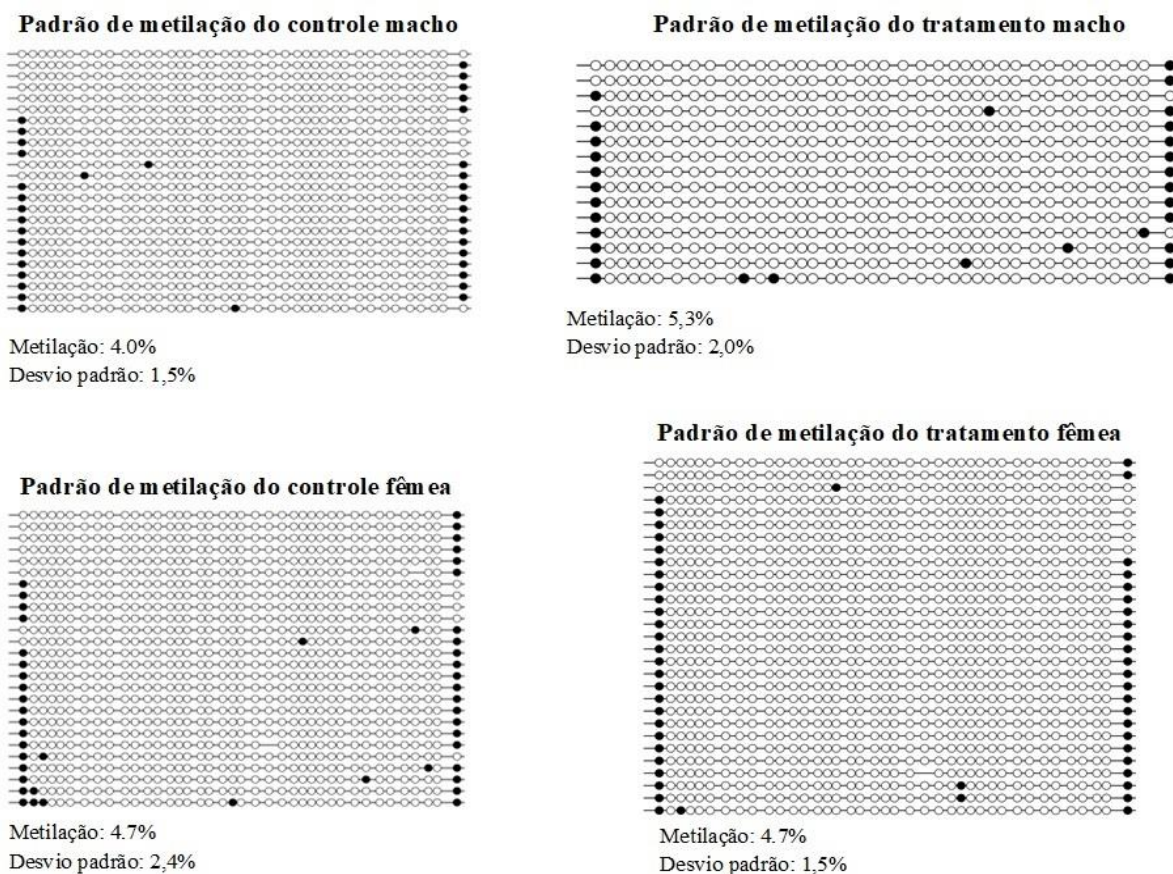


Figura 1. Padrões de metilação dos grupos experimentais

Legenda: Círculos brancos representam CpGs não metiladas e círculos pretos as CpGs metiladas.

A comparação entre os grupos experimentais (controle macho x controle fêmea; tratamento macho x tratamento fêmea) sobre o padrão de metilação estão representados na Figura 2. Na Figura 3 está representado a comparação entre controle macho x tratamento macho; controle fêmea x tratamento fêmea, de acordo com o padrão de metilação dos grupos. Os resultados do p-valor dos testes de Mann-Whitney (comparação entre os grupos), e Fisher (comparação de citosina entre os grupos) foram incluídos na Figura 3, sendo que não houve diferença significativa entre os grupos.

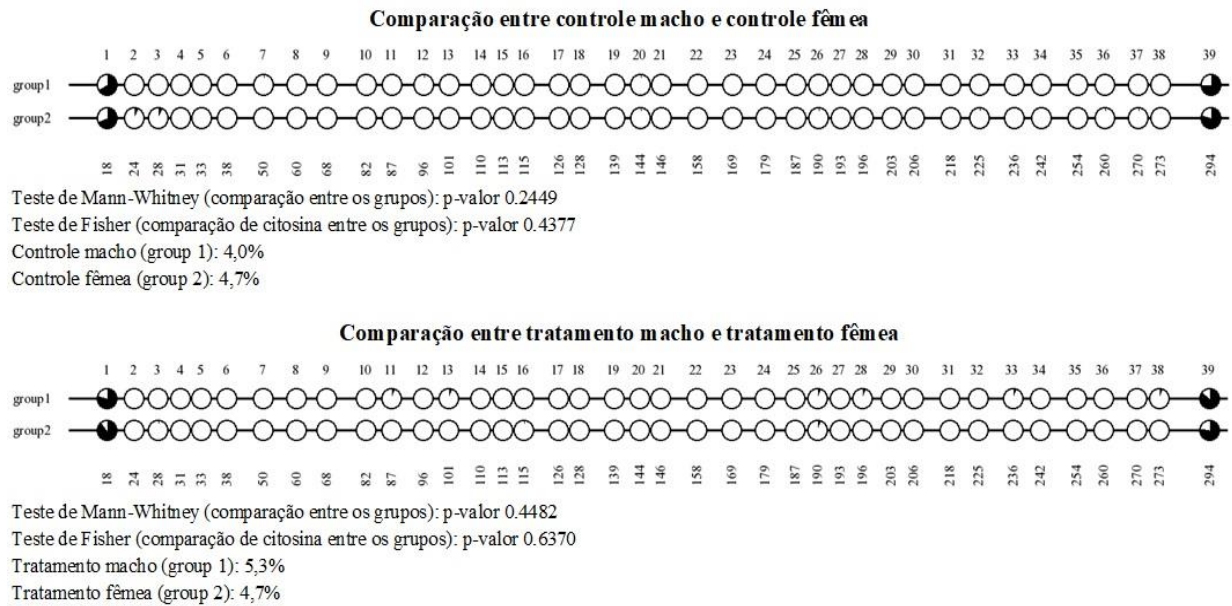


Figura 2. Comparação de padrão de metilação entre machos e fêmeas dos tratamentos

Legenda: Círculos brancos representam CpGs não metiladas e círculos pretos as CpGs metiladas.

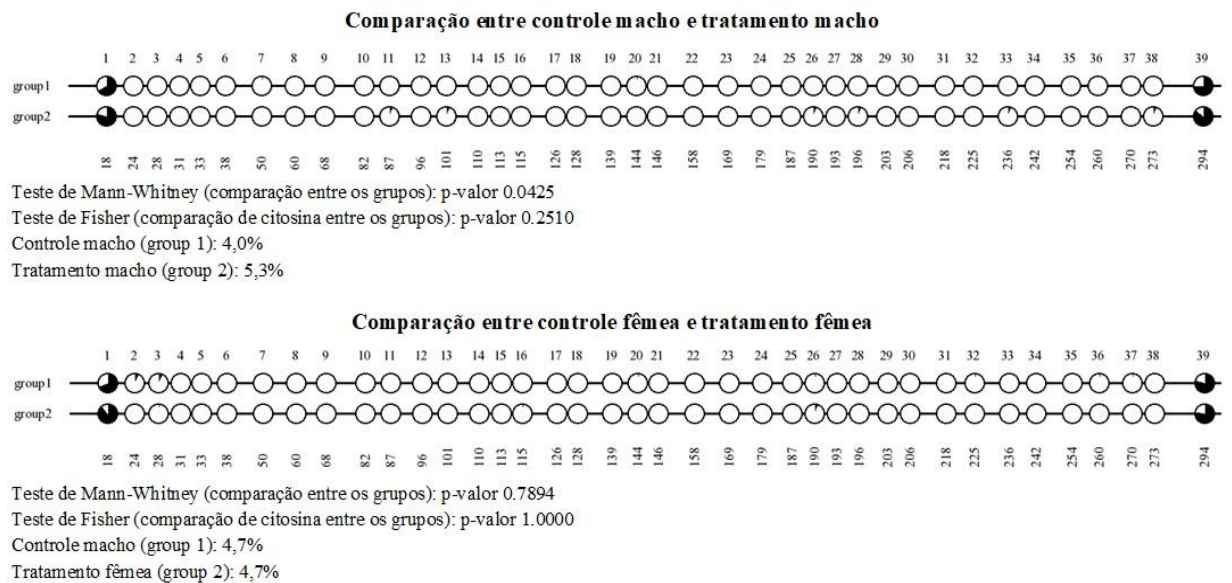


Figura 3. Comparação de padrão de metilação entre controle e tratamento, nos diferentes gêneros

Legenda: Círculos brancos representam CpGs não metiladas e círculos pretos as CpGs metiladas.

Expressão gênica

Para análise da expressão gênica, quatro combinações do esquema fatorial foram testadas: 1) M-C (macho-controle); 2) M-T (macho-tratamento); 3) F-C (fêmea-controle) e 4)

F-T (fêmea-tratamento), e foram avaliados cinco genes, sendo *NR3C1*, *NR3C2*, *FKBP5*, *HTR1A* e *BDNF*. A variável resposta é um valor numérico referente a uma razão (ratio) da expressão gênica (EG), sendo que fator escolhido para comparação foi macho controle de cada gene e, foram realizadas cinco repetições. Na Tabela 6, estão os resultados da razão de todos os tratamentos em comparação com o M-C, que apresenta a variável resposta (*ratio*) igual a uma unidade. Nota-se que a repetição 1 do tratamento F-C gene *NR3C1*, a razão é 0,92875, e isto significa que a variável contínua mensurada em F-C, do gene *NR3C1*, é 92,875% do valor da mesma variável contínua mensurada em M-C do gene *NR3C1* na repetição 1.

Tabela 6. Razão de todos os tratamentos em comparação com o M-C (base de comparação)

Repetição	Tratamento	Gene <i>NR3C1</i>	Gene <i>NR3C2</i>	Gene <i>FKBP5</i>	Gene <i>HTR1A</i>	Gene <i>BDNF</i>
Repetição 1	M-C	1	1	1	1	1
	F-C	0,928749	0,612768	0,791408	0,872419	0,584673
	M-T	0,658556	0,841609	0,684107	0,731787	0,788188
	F-T	0,824977	0,537081	0,731278	0,590968	0,463335
Repetição2	M-C	1	1	1	1	1
	F-C	0,750173	1,191877	0,70566	1,634652	0,924527
	M-T	0,786997	1,257043	0,746778	1,955197	1,225466
	F-T	1,529833	1,068937	1,638008	1,26266	0,710687
Repetição 3	M-C	1	1	1	1	1
	F-C	0,852542	0,804325	0,680994	1,434996	1,036655
	M-T	0,881405	0,691349	0,67432	1,174479	0,589812
	F-T	0,922582	0,946239	0,827917	0,592147	0,796725
Repetição 4	M-C	1	1	1	1	1
	F-C	1,139618	0,835929	1,12557	0,565283	0,806408
	M-T	0,948959	1,161575	1,102873	1,169048	1,097792
	F-T	1,505829	1,601556	1,856987	1,590777	1,433464
Repetição 5	M-C	1	1	1	1	1
	F-C	0,765197	0,633769	0,476928	3,25838	1,024851
	M-T	1,071577	1,425397	0,625483	2,649044	1,862698
	F-T	1,036237	1,428291	0,678023	4,554298	1,776523

Legenda: M-C: macho controle; F-C: fêmea controle; M-T: macho tratamento; F-T: fêmea tratamento

Na Figura 4, estão apresentados os gráficos do tipo *boxplot* dos valores de *ratio* sobre cada uma das duas variáveis. Na Figura 5, estão representados o gráfico de *boxplot* dos valores de *ratio* por gene, e na figura 6 está o *boxplot* dos valores de *ratio* por tratamento.

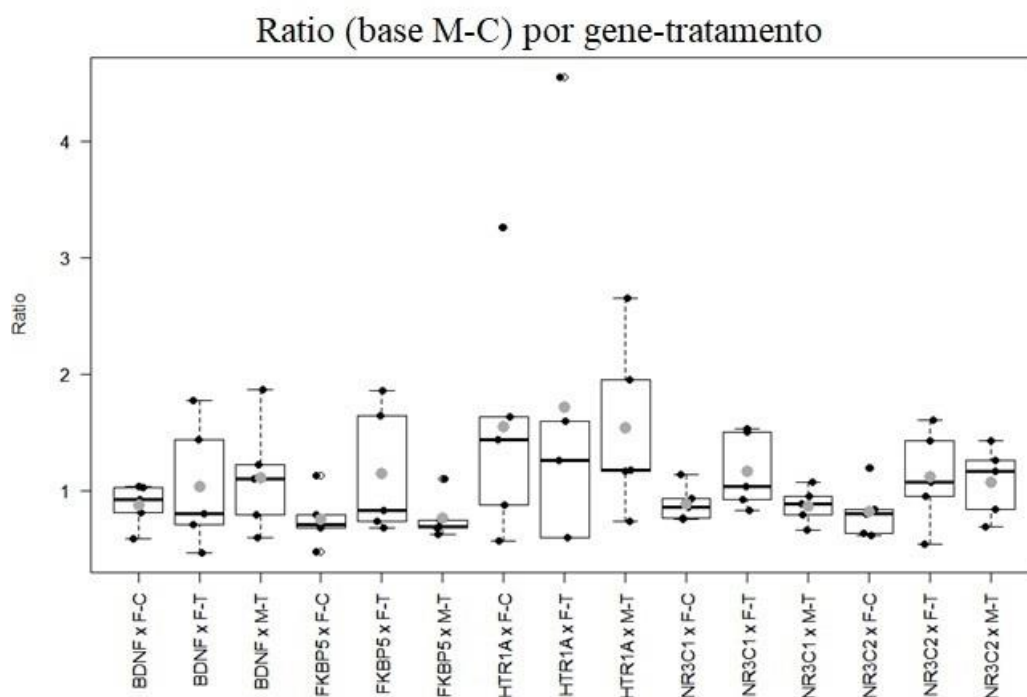


Figura 4. *Boxplot* dos valores de *ratio* por gene-tratamento

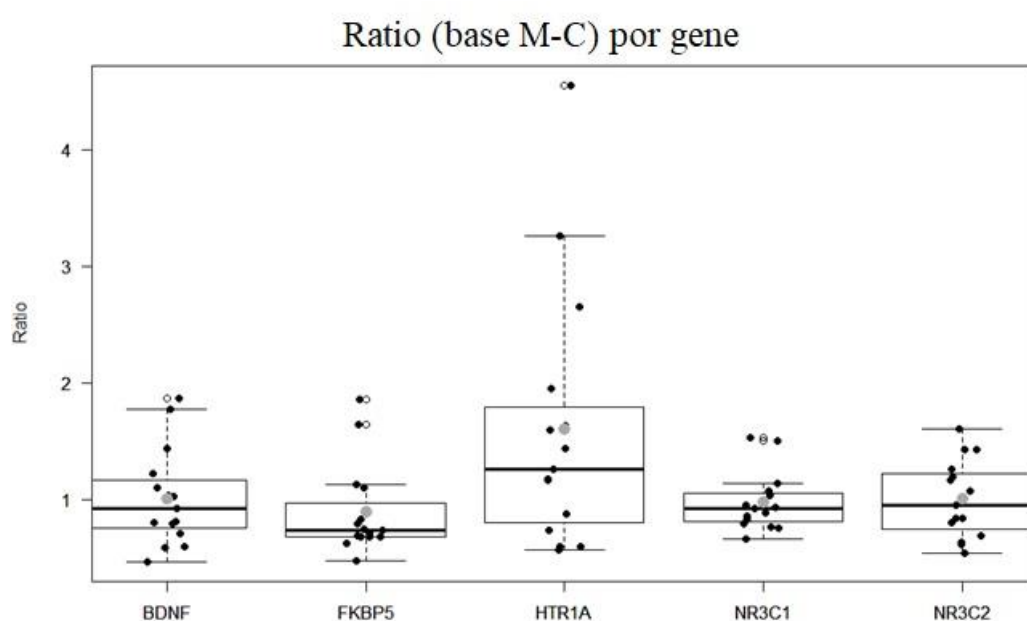


Figura 5. *Boxplot* dos valores de *ratio* por gene

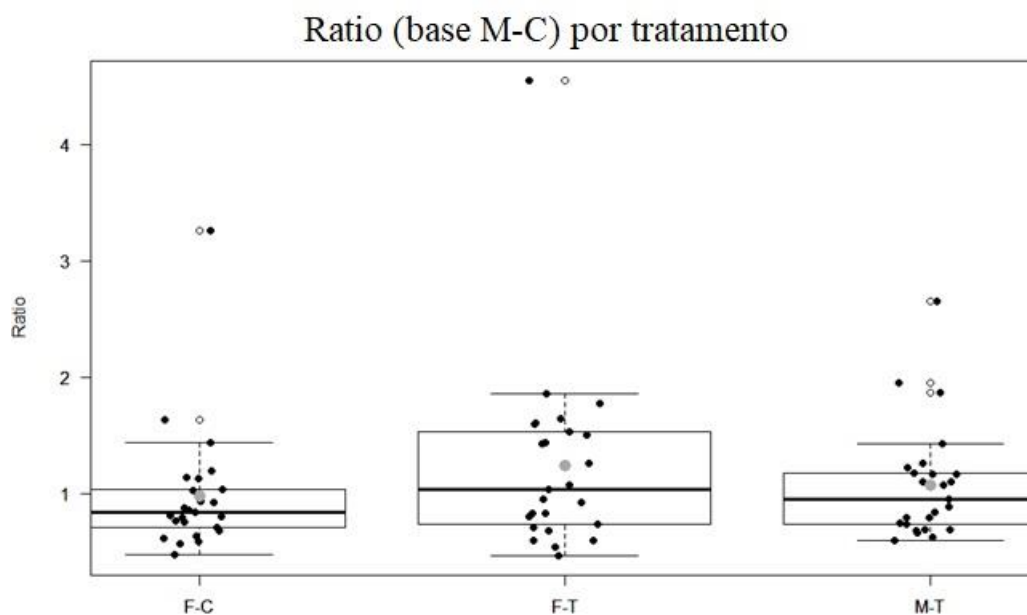


Figura 6. Boxplot dos valores de *ratio* por tratamento

Como os resultados dos gráficos *boxplot* não sugerem diferenças dos grupos e genes estudados, e existem duas possíveis variáveis explicativas (tratamento e gene), foi necessário avaliar uma possível interação entre estes fatores (gene x tratamento), representado na Figura 7. De acordo com o resultado, não houve interação entre os tratamentos.

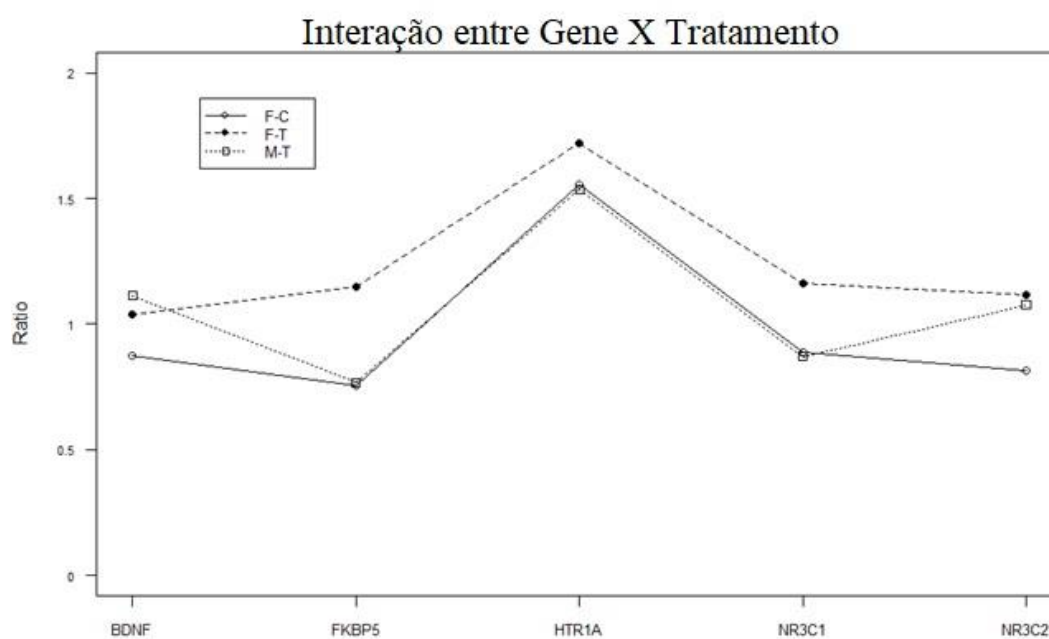


Figura 7. Gráfico de interação entre gene e tratamento

Por fim, foram avaliados diferentes modelos de regressão linear múltipla com as duas possíveis variáveis explicativas (gene e tratamento). Para decidir a escolha do melhor modelo representativo dos dados, foi considerado o valor do critério de informação de Akaike de segunda ordem (AICc), que é um valor ajustado do “clássico”, o valor de AIC (*Akaike Information Criterion*), e o valor do critério de informação bayesiano BIC (*Bayesian Information Criterion*), sendo o modelo de AICc realizado no estudo (modelo: $Y \sim G + T$; T: tratamento, G: gene, Y: *ratio*: variável resposta). No presente trabalho, é esperado que o tratamento explique o comportamento da razão, porém, também foi analisado o efeito do gene para possivelmente explicar a variável resposta *ratio*. Foi verificado a normalidade dos resíduos do modelo $Y \sim G + T$, e homocedasticidade dos grupos de comparação através do teste de Levene (p-valor: 0,1751).

Por fim, foi realizada a análise de comparações múltiplas de interesse considerando homocedasticidade dos grupos de comparação, e os resultados estão representados na Tabela 7 abaixo. Não houve diferenças significativas, ao nível de 5% de probabilidade ($\Pr(>|t|)$ abaixo de 5%). Portanto, os resultados não demonstraram evidência de que há diferença significativa de *ratio* entre os tratamentos em cada gene com base na amostra analisada.

Tabela 7. Resultado das comparações múltiplas dos grupos de comparação

Gene	Hipótese	Valor de $\Pr(> t)$
<i>NR3C1</i>	M-T x F-T	0.517
<i>NR3C1</i>	F-C x F-T	0.218
<i>NR3C2</i>	M-T x F-T	0.517
<i>NR3C2</i>	F-C x F-T	0.218
<i>FKBP5</i>	M-T x F-T	0.517
<i>FKBP5</i>	F-C x F-T	0.218
<i>HTR1A</i>	M-T x F-T	0.517
<i>HTR1A</i>	F-C x F-T	0.218
<i>BDNF</i>	M-T x F-T	0.517
<i>BDNF</i>	F-C x F-T	0.218

Formúla = *Ratio* ~ Gene + Tratamento

$\Pr(>|t|)$ abaixo de 5% é considerado não significativo

Discussão

Após 24 e 48 horas do desmame precoce, os leitões obtiveram maior número de lesões corporais se comparados com o grupo controle. A hipótese inicial do presente trabalho foi que animais desmamados precocemente, poderiam inibir a neurogênese, e prejudicar a aquisição e consolidação de memorização emocional, aprendizado e adaptação, em relação à disputa pela nova hierarquia de grupo. Portanto, os resultados das lesões corporais podem ser explicados pelas alterações hipocampais provocadas pelo estresse, que interfere na elaboração de respostas emocionais frente a ameaças e disputas. Essa nova experiência do desmame modularia de forma negativa os processos plásticos sediados no hipocampo envolvidos com o processamento de informações [26].

Após quatro dias do desmame precoce, ambos os grupos obtiveram resultado semelhante quanto à quantidade de lesões, sendo que o grupo controle apresentou maior número de brigas e lesões. Este resultado pode ser analisado conforme a variação da produção de leite e maior demanda de leite pelos leitões. De acordo com [27], as necessidades energéticas para a produção de leite aumentam progressivamente durante as três primeiras semanas de lactação, sendo influenciadas principalmente pelo tamanho da leitegada. Portanto, aos 14 dias de idade, há uma maior demanda de leite pelos leitões, com consequente redução da produção e ejeção do leite pela fêmea, e isso promove um aumento dos conflitos entre os leitões que permaneceram na mãe.

Segundo [27, 28], leitões que são criados em sistemas de amamentação múltipla demonstram menor agressividade se comparados com leitões desconhecidos em um teste de confronto social, e após o desmame. Sendo assim, mesmo que os leitões desmamados precocemente aos 10 dias de idade apresentam maior agressividade nos primeiros dias, esses animais, futuramente, podem apresentar uma hostilidade reduzida, decorrente de diversos motivos. No presente trabalho, não foi mensurada as lesões corporais em animais aos 21 dias,

porém, no teste de campo aberto e objeto novo, os animais desmamados precocemente responderam de forma mais tranquila se comparado com o grupo desmamado aos 21 dias. Isto sugere-se pelo aumento da capacidade de desenvolvimento social dos leitões no desmame possibilitar melhor a expressão de comportamento ameaçador e submisso [30].

Os resultados comportamentais obtidos no presente trabalho relevaram que os leitões desmamados aos 10 dias apresentaram menor quantidade de vocalização no teste de campo aberto, e menor latência em interagir com o artefato, além de maior proximidade e interação o objeto. Esses dados sugerem que leitões desmamados precocemente apresentam uma maior passividade e menor reatividade em resposta ao desafio de campo aberto. No teste do objeto novo, esses mesmos animais apresentaram um maior interesse e menor insegurança em resposta à nova situação. Tais resultados corroboram com [31], que mostraram uma inibição comportamental, com vocalizações reduzidas e menor atividade, em comparação com leitões desmamados mais tardiamente. Isso sugere-se pela redução da ansiedade e estresse, resultantes da maior habituação ao teste promovido.

Em contraste, os leitões desmamados aos 21 dias apresentaram no teste do campo aberto, uma conduta mais ativa e maior frequência de comportamentos indicativos de estresse, com vocalizações agudas. Tal resultado é semelhante ao estudo de [32], que comparou o desmame em três e seis semanas, e leitões desmamados precocemente reagiram menos ao teste de campo se comparados com o desmame mais tardio. Portanto, de uma forma geral, os animais desmamados precocemente conseguiram uma adaptação mais rápida a situações estressantes, contradizendo [9], que afirmam que o descuido materno altera o desenvolvimento neuronal e de comportamento, pelo aumento da memória para reflexos condicionados adquiridos na vida. Contudo, animais desmamados precocemente, apesar do estresse excessivo no início da vida, possivelmente não desenvolveram habilidades e reflexos através da memorização, para novos eventos supostamente estressantes, e estavam mais habituados na situação.

O descuido materno em mamíferos no início da vida promove alterações epigenéticas em células neurais, levando à expressão gênica alterada [12, 33, 34]. Em ratos, variações nos cuidados maternos na primeira semana de vida estão associadas a alterações epigenéticas da região promotora do gene *NR3C1*, afetando a expressão gênica da variante de *splicing* do GR do gene *NR3C1* no hipocampo da prole adulta [18]. No presente trabalho, não houve alteração da metilação na região de ligação da NGFI-A, localizado no gene do GR do hipocampo (*NR3C1*).

De acordo com o estudo de [18], os autores consideraram um padrão de metilação alto acima de 20% em animais que tiveram pouco cuidado materno, sendo que a qualidade do cuidado materno interfere diretamente nas alterações epigenéticas até a vida adulta da prole. No presente estudo, não houve diferença significativa de metilação entre os grupos estudados de acordo com o gênero, desmame precoce e convencional. O padrão de metilação ficou abaixo de 10%. Portanto, é possível que o cuidado materno até os 10 dias de idade seja suficiente para não gerar alterações epigenéticas significativas nos leitões desmamados precocemente.

Além disso, na suinocultura moderna, os cuidados maternos ficam restritos apenas à presença, tranquilidade e reatividade da matriz perante a vocalização do leitão, diferentemente dos estudos realizados em ratos, em que a fêmea lambe e higieniza os filhotes, ou sejam, apresentam cuidados mais próximos e amistosos com a sua prole [35, 36]. Sendo assim, o cuidado materno restrito em ambos os grupos experimentais na espécie suína, independente do tempo, é possível que seja suficiente para não promover alterações de metilação do DNA, e consequentemente, não ocasionar o silenciamento do gene codificador de GR no hipocampo.

Com relação à expressão gênica, os genes avaliados (*NR3C1*, *NR3C2*, *FKBP5*, *HTR1A* e *BDNF*) participam da regulação do estresse no sistema nervoso central, especificamente no hipocampo. A comparação realizada entre os grupos experimentais (gênero e tratamentos) não foi significativa para nenhum gene. Sabe-se que os genes *NR3C1* e *NR3C2* influenciam nos

comportamentos emocionais e cognitivos, sendo que a variação genética para GR é relacionada com a disfunção da atenção, enquanto a MR é correlacionada com distúrbios de memorização [37]. Adicionalmente, o descuido materno promove alterações no local de ligação da proteína induzida pelo fator de crescimento do nervo I (NGFI-A), localizado no gene do GR do hipocampo (*NR3C1*), no promotor do exon 1(7), levando à diminuição da expressão de *NR3C1* [18]. Porém, no presente trabalho, a ausência materna após os 10 dias de vida não foi suficiente para provocar alterações na expressão desses dois genes.

O gene *FKBP5* codifica a proteína de ligação FK506, que é uma proteína de choque térmico (HSP-90), importante reguladora da função do GR. A proteína de ligação FK506 atua como um regulador negativo da transcrição de GR, via redução da afinidade de ligação de glicocorticoide e translocação nuclear do RG, ou seja, apresenta papel importante na sensibilidade dos GR ao cortisol [38]. No experimento, possivelmente o estresse provocado pelo desmame aos 10 dias, não provocou alteração da ligação dos glicocorticoides no GR do hipocampo.

Variações da transcrição do gene *HTR1A* estão relacionadas com o comportamento defensivo, na plasticidade neural, e no comportamento de defesa [39]. Ademais, o gene *HTR1A*, que codifica o receptor da serotonina, um neurotransmissor importante na regulação da emoção e processos de controle comportamental, e a ligação dessa substância nesse receptor, induz um aumento de NGFI-A na transcrição de GR em neurônios do hipocampo [40]. Portanto, esse aumento de NGFI-A leva a um aumento da expressão de GR na idade adulta. Entretanto, os resultados desse estudo sobre a serotonina e NGFI-A não foram mediadores chave dos efeitos do desmame precoce.

O fator neurotrófico derivado do cérebro (*BDNF*) é um elemento crucial do desenvolvimento do cérebro ao longo da vida, desde a infância até a idade adulta, e promove a neurogênese e a plasticidade sináptica [40], além de influenciar a função no hipocampo [41]. A

sua expressão está sob a influência de experiências individuais, sendo a mais importante o cuidado materno [42]. Como demonstrado também nos outros genes, no presente trabalho não houve diferença na expressão desse gene, indicando que a separação entre a mãe e os filhotes não provocou alterações nas respostas adaptativas do sistema nervoso.

De modo geral, os resultados da expressão gênica demonstram que não há diferença significativa dos tratamentos e os diferentes genes estudados, e isso pode ser explicado que os animais submetidos no experimento vivenciaram diferentes eventos estressantes durante todo o ciclo produtivo da granja, e apresentaram diferentes respostas adaptativas, sendo que o desmame precoce é apenas mais um desses eventos desafiadores.

Conclusão

A ausência do cuidado materno em suínos desmamados a partir dos 10 dias de idade altera o comportamento dos leitões na agressividade, e em situações estressantes, os animais desmamados precocemente demonstram uma maior habituação. Além disso, não há uma remodelação epigenética e alteração da expressão dos genes relacionados ao estresse (*NR3C1*, *NR3C2*, *FKBP5*, *HTR1A* e *BDNF*), sendo necessários mais estudos para compreender os mecanismos do estresse em regiões do sistema nervoso central na espécie suína, que possivelmente, é diferente da regulação do estresse que ocorre em ratos e camundongos. Adicionalmente, essas modificações epigenéticas podem ser transitórias ao longo de toda a vida do animal, e de outro modo, as alterações epigenéticas podem ter acontecido em outras regiões genômicas ou em genes diferentes que não foram englobados nesta pesquisa.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen), Fazenda Cinco Estrelas, Cooperativa de Suinocultores LTDA (Suinco) e

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos também ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia.

Referências

1. Worobec E, Duncan IJH, Widowski TM. The effect of weaning at 7, 14 and 28 days on piglet behaviour. *Applied animal behaviour science*. 1999; 62(2-3):173-82.
[https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(98\)00225-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(98)00225-1)
2. Rasby R. Early weaning beef calves. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*. 2007; 23(1):29-40. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.01.002> PMID: 17382839
3. Kreiker M, Perez K, Brown KL. The effects of early weaning on Pavlovian fear conditioning in young rats. *Developmental psychobiology*. 2021; 63(6):e22133.
<https://doi.org/10.1002/dev.22133> PMID: 34423435
4. Juruena MF, Erer F, Cleare AJ, Young AH. The Role of Early Life Stress in HPA Axis and Anxiety. *Advances in experimental medicine and biology*. 2020; 1191:141-153.
https://doi.org/10.1007/978-981-32-9705-0_9 PMID: 32002927
5. Kikusui T, Ishio Y, Nagasawa M, Mogil JS, Mogi K. Early weaning impairs a social contagion of pain-related stretching behavior in mice. *Developmental psychobiology*. 2016; 58(8):1101-07. <https://doi.org/10.1002/dev.21443> PMID: 27364014
6. Kikusui T, Ichikawa S, Mori Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal *BDNF* and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; 34(5):762-72.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.12.009> PMID: 19167168
7. Penke Z, Felszeghy K, Fernet B, Sage D, Nyakas C, Burlet A. Postnatal maternal deprivation produces long-lasting modifications of the stress response, feeding and stress-

related behaviour in the rat. *The European journal of neuroscience*. 2001; 14(4):747-55.

<https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01691.x> PMID: 11556899

8. Sánchez MM, Ladd CO, Plotsky PM. Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: evidence from rodent and primate models. *Development and psychopathology*. 2001; 13(3):419-49. <https://doi.org/10.1017/s0954579401003029> PMID: 11523842

9. Kreiker M, Perez K, Brown KL. The effects of early weaning on Pavlovian fear conditioning in young rats. *Developmental psychobiology*. 2021; 63(6):e22133.

<https://doi.org/10.1002/dev.22133> PMID: 34423435

10. Newberry RC, Wood-Gush DGM. The suckling behaviour of domestic pigs in a semi-natural environment. *Behaviour*. 1985; 95(1):11-25.

<https://doi.org/10.1163/156853985X00028>.

11. Weary DM, Appleby MC, Fraser D. Responses of piglets to early separation from the sow. *Applied Animal Behaviour Science*. 1999; 63(4): 289-300.

[https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(99\)00021-0](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(99)00021-0)

12. Weaver SA, Aherne FX, Meaney MJ, Schaefer AL, Dixon WT. Neonatal handling permanently alters hypothalamic-pituitary-adrenal axis function, behaviour, and body weight in boars. *The Journal of endocrinology*. 2000; 164(3):349-59.

<https://doi.org/10.1677/joe.0.1640349> PMID: 10694375

13. Yuan Y, Jansen J, Charles D, Zanella AJ. The influence of weaning age on post-mixing agonistic interactions in growing pigs. *Applied Animal Behaviour Science*. 2004; 88(1-2):39-46. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.01.012>

14. Holmes A, Guisquet AM, Vogel E, Millstein RA, Leman S, Belzung C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents.

Neuroscience and biobehavioral reviews. 2005; 29(8):1335-46.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.012> PMID: 16095695

15. Muhammad, A., & Kolb, B. Maternal separation altered behavior and neuronal spine density without influencing amphetamine sensitization. *Behavioural brain research*. 2011; 223(1):7-16. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.04.015> PMID: 21515311

16. Gudsnek KMA, Champagne FA. Epigenetic effects of early developmental experiences. *Clinics in perinatology*. 2011; 38(4):703-17. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2011.08.005> PMID: 22107899

17. Kanitz E, Manteuffel G, Otten W. Effects of weaning and restraint stress on glucocorticoid receptor binding capacity in limbic areas of domestic pigs. *Brain research*. 1998; 804(2):311-5. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00712-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00712-4) PMID: 9757073

18. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*. 2004; 7(8):847-54. <https://doi.org/10.1038/nn1276> PMID: 15220929

19. Hyman SE. How adversity gets under the skin. *Nature neuroscience*. 2009; 12(3):241-3. <https://doi.org/10.1038/nn0309-241> PMID: 19238182

20. Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic- pituitary-adrenal responses to stress. *Science*. 1997; 277(5332):1659-62. <https://doi.org/10.1126/science.277.5332.1659> PMID: 9287218

21. Francis D, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*, 1999; 286(5442):1155-8. <https://doi.org/10.1126/science.286.5442.1155> PMID: 10550053

22. Puppe B, Ernst k, Schön PC, Manteuffel G. Cognitive enrichment affects behavioural reactivity in domestic pigs. *Applied Animal Behaviour Science*. 2007; 105(1-3):75-86.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.05.016>
23. Estatcamp E. *Software Action*. São Carlos: Estatcamp: Consultoria em estatística e qualidade, 2014.
24. Biase FH, Franco MM, Goulart LR, Antunes RC. Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. *Genetics and Molecular Biology*. 2002; 25(3):313-315.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572002000300011>
25. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001; 29(9):e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45> PMID: 11328886
26. Mcgaugh JL. Memory-a century of consolidation. *Neuroscience*. 2000; 287(5451):248-51.
<https://doi.org/10.1126/science.287.5451.248> PMID: 10634773
27. Quesnel H, Prunier A. Endocrine bases of lactational anoestrus in the sow. *Reproduction, nutrition, development*. 1995; 35(4):395-414. <https://doi.org/10.1051/rnd:19950405> PMID: 7546231
28. Hillmann E, Von Hollen F, Bünger B, Todt D, Schrader L. Farrowing conditions affect the reactions of piglets towards novel environment and social confrontation at weaning. *Applied Animal Behaviour Science*. 2003;81(2):99-109. [https://doi.org/10.1016/S0168-1591\(02\)00254-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1591(02)00254-X)
29. Li Y, Wang L. Effects of previous housing system on agonistic behaviors of growing pigs at mixing. *Applied Animal Behaviour Science*. 2011;132(1-2):20-26.
<https://doi.org/10.1016/j.applanim.2011.03.009>
30. Lammers GJ, Schouten WGP 1985. Effects of pen size during rearing on later agonistic behaviour in piglets. *Netherlands Journal of Agricultural Science*. 1985;33:307-309.

31. Sumner BE, D'Eath RB, Farnworth MJ, Robson S, Russell JA, Lawrence AB, et al. Early weaning results in less active behaviour, accompanied by lower 5-HT1A and higher 5-HT2A receptor mRNA expression in specific brain regions of female pigs. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(8):1077-92.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.05.004> PMID: 18653286
32. Dantzer R, Mormède P. Influence of weaning time on piglet behavior and pituitary-adrenal reactivity. *Reproduction, nutrition, développement*. 1981; 21(5A):661-70. PMID: 7349550
33. Bagot RC, Zhang TY, Wen X, Nguyen TT, Nguyen HB, Diorio J, et al. Variations in postnatal maternal care and the epigenetic regulation of metabotropic glutamate receptor 1 expression and hippocampal function in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012; 109 Suppl 2(Suppl 2):17200-7.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1204599109> PMID: 23045678
34. McGowan PO, Suderman M, Sasaki A, Huang TC, Hallett M, Meaney MJ, et al. Broad epigenetic signature of maternal care in the brain of adult rats. *Plos One*. 2011; 6(2):e14739.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014739> PMID: 21386994
35. Meaney MJ, Szyf M. Environmental programming of stress responses through DNA methylation: life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues in clinical neuroscience*. 2005;7(2):103-23.
<https://doi.org/10.31887/DCNS.2005.7.2/mmeaney> PMID: 16262207
36. Hellstrom IC, Dhir SK, Diorio JC, Meaney MJ. Maternal licking regulates hippocampal glucocorticoid receptor transcription through a thyroid hormone-serotonin-NGFI-A signalling cascade. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. 2012;367(1601):2495-510. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0223> PMID: 22826348

37. Keller J, Gomez R, Williams G, Lembke A, Lazzeroni L, Murphy GM Jr, et al. HPA axis in major depression: cortisol, clinical symptomatology and genetic variation predict cognition. *Molecular psychiatry*. 2017; 22(4):527-536. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.120> PMID: 27528460
38. Zhang X, Clark AF, Yorio T. FK506-binding protein 51 regulates nuclear transport of the glucocorticoid receptor β and glucocorticoid responsiveness. *Investigative ophthalmology and visual science*. 2008; 49(3):1037-47. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1279> PMID: 18326728
39. Straube B, Reif A, Richter J, Lueken U, Weber H, Arolt V, et al. The functional -1019C/G *HTR1A* polymorphism and mechanisms of fear. *Translational psychiatry*. 2014;4(12):e490. <https://doi.org/10.1038/tp.2014.130> PMID: 25514753
40. Scharfman HE, Goodman JH, MacLeod A, Phani S, Antonelli C, Croll SD. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal *BDNF* infusion in adult rats. *Experimental neurology*. 2005; 192(2):348-56. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.11.016> PMID: 15755552
41. von Bohlen Und Halbach O, von Bohlen Und Halbach. *BDNF* effects on dendritic spine morphology and hippocampal function. *Cell and tissue research*. 2018; 373(3):729-741. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2782-x> PMID: 29450725
42. Branchi I, Curley JP, D'Andrea I, Cirulli F, Champagne FA, Alleva E. Early interactions with mother and peers independently build adult social skills and shape *BDNF* and oxytocin receptor brain levels. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; 38(4):522-32. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2012.07.010> PMID: 22910688

CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desmame precoce antes dos 21 dias de idade do leitão é alternativa para minimizar o desgaste de fêmeas hiperprolíficas que possuem leitegadas numerosas proveniente de fêmeas hiperprolíficas. Além disso, é uma ferramenta para otimizar a reprodução das granjas suínolas, e almejar a melhora significativa nos dias não produtivos (DNPs), além de aumentar o número de leitões desmamados/fêmea/ano. Outros manejos como mães de leite e lactação coletiva ainda necessitam de estudos para serem aperfeiçoados. O manejo de mães de leites apresenta diversos fatores negativos, como uma maior mortalidade de leitões na maternidade, um maior intervalo-desmame-estro (IDE), aumento no período de lactação, e com isso, diminui o índice de partos/matriz/ano. Adicionalmente, as fêmeas destinadas ao manejo de mães de leite podem manifestar estro durante a prática, aumentando assim os DNPs na granja. No que se refere à lactação coletiva, diversos trabalhos analisam esta prática para que se torne viável e mais aceita do ponto de vista de bem-estar animal.

O desmame precoce é utilizado pois a produção de leitões supranumerários é uma realidade nas granjas. Porém, esta prática é considerada estressante para os leitões por não terem uma adaptação à nova dieta, pela mudança repentina de ambiente e separação da mãe, além de não apresentarem imunidade ativa desenvolvida. Sendo assim, estudos sobre os danos no desempenho produtivo, assim como os aspectos relacionados à saúde mental e psicológica dos leitões são necessários. Sobre a produção animal, o animal desmamado precocemente reduz o seu ganho de peso justamente pela falta do leite materno, que, mesmo com os substitutos de leite no mercado, os animais não conseguem atingir um desempenho satisfatório. Além disso, esta prática evidencia um aumento da incidência de doenças, e compromete o crescimento dos animais e aumento da mortalidade. Ademais, quanto mais jovens são os animais ao desmame, mais graves são os problemas produtivos.

Do ponto de vista de bem-estar animal, o desmame precoce é desfavorável, pois os leitões apresentam comportamentos anormais imediatos como o aumento da vocalização, das brigas, de caminhadas pela baia e vícios de sucção. Diferentes estudos em camundongos e ratos destacam que a separação entre a mãe e filhotes no início da vida alteram o comportamento sobre o estresse ao longo da vida. Essas alterações acontecem através de mecanismos epigenéticos e de expressão gênica, sendo que a metilação do DNA, um exemplo de modificação epigenética, provoca silenciamento de genes importantes na regulação do estresse em áreas do sistema límbico. Porém, no presente trabalho, não foram constatadas essas alterações epigenéticas e de expressão dos genes *NR3C1*, *NR3C2*, *FKBP5*, *HTR1A* e *BDNF*, apenas foram evidenciadas alterações de comportamento, sendo que animais desmamados precocemente apresentaram um comportamento mais agressivo logo após o desmame, e maior

passividade e menor reatividade em resposta às situações desafiadoras e estressantes. Sendo assim, é possível que haja alterações de expressão gênica no sistema límbico de leitões desmamados precocemente, e possivelmente, essas alterações são diferentes se comparadas com os estudos em ratos e camundongos.

O bem-estar animal é um ponto crítico na produção de suínos, e nos últimos tempos, esse conceito teve uma maior notoriedade mundial. No Brasil, alguns manejos realizados, como o desmame precoce, utilização de gaiolas nas fases de gestação e maternidade, ambiente restrito, entre outros, podem afetar o bem-estar dos animais nas granjas. Porém, existe um prazo para adequação dessas práticas na produção de suínos perante a lei. Sobre o desmame precoce, a granja deverá ampliar a idade de separação da mãe e do leitão para no mínimo 24 dias. Sendo assim, é uma prática que, futuramente, não terá aplicação no Brasil.

ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Desmame precoce em leitões: avaliação zootécnica e comportamento animal”, protocolo nº 072/19, sob a responsabilidade de **Stenia Severo Rabelo** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **01 de Novembro de 2019**.

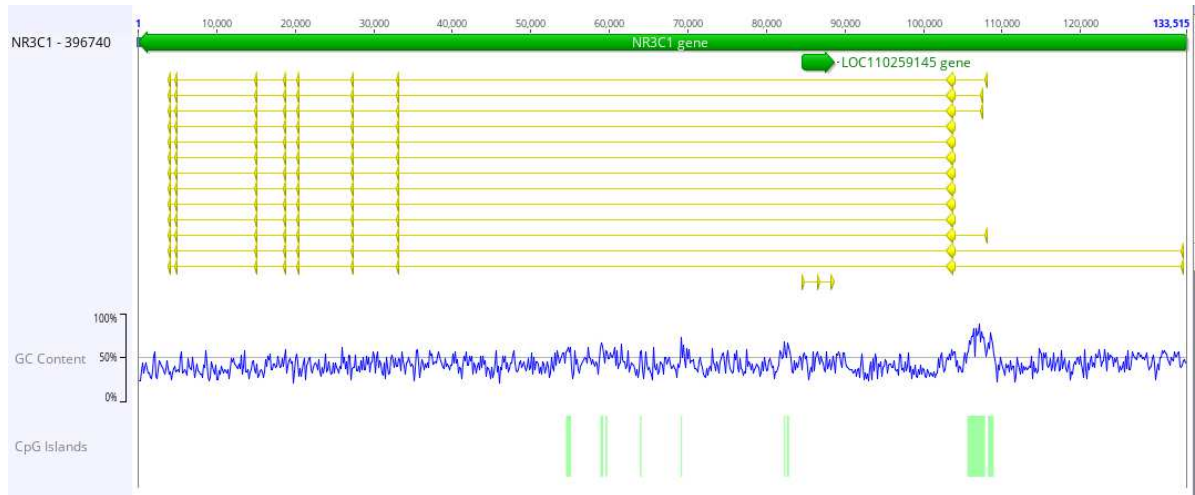
(We certify that the project entitled “Desmame precoce em leitões: avaliação zootécnica e comportamento animal”, protocol 072/19, under the responsibility of **Stenia Severo Rabelo** - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of November 01st, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 20/11/2019 Término: 20/08/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	<i>S. domesticus</i>
Número de animais	288
Peso / Idade	1 a 100 Kg / 21-160 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem / Local	Granja comercial localizada no município de Patrocínio-MG (Granja Cinco estrelas)
Local onde serão mantidos os animais:	Fazenda Cinco Estrelas, localizada no município de Patrocínio-MG

Uberlândia, 06 de Novembro de 2019.


Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Comissão de Ética na Utilização de Animais /UFU
Coordenador da CEUA
Portaria Nº 1234 DE 01 DE OUTUBRO DE 2019

Anexo 1. Certificado de aprovação para realização do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



Anexo 2. Quantidade de ilhas CpG, em verde, do gene *NR3C1*



Anexo 3. Local dos *primers outer* (forward e reverse) em verde, e local dos *primers inner* (forward e reverse) em amarelo