

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**AVALIAÇÃO DO USO DE ESPELHO COMO FERRAMENTA DE
ENRIQUECIMENTO AMBIENTAL EM OVELHAS UTILIZADAS COMO ANIMAIS
DE EXPERIMENTAÇÃO**

Fabíola Schons Meyer

PORTO ALEGRE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

AVALIAÇÃO DE ESPELHO COMO FERRAMENTA DE ENRIQUECIMENTO
AMBIENTAL EM OVELHAS UTILIZADAS COMO ANIMAL DE
EXPERIMENTAÇÃO

Autor: Fabíola Schons Meyer

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias como requisito
para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. André Silva Caríssimi

PORTO ALEGRE

2010

M612a Meyer, Fabíola Schons

Avaliação de espelho como ferramenta de enriquecimento ambiental em ovelhas utilizadas como animal de experimentação. / Fabíola Schons Meyer. – Porto Alegre: UFRGS, 2010.

55 f. ; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2010. André Silva Caríssimi, Orient.

1. Comportamento animal 2. Ovinos 3. Enriquecimento ambiental
I. Caríssimi, André Silva, Orient. II. Título

CDD 636.08

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabíola Schons Meyer

Avaliação do uso de espelho como ferramenta de enriquecimento ambiental em ovelhas utilizadas como animais de experimentação

Aprovada em 30 de março de 2010.

Aprovada por:

Prof. Dr. André Silva Caríssimi, UFRGS
Orientador

Profa. Dra. Ender Rosana Oberst, UFRGS
Membro da Comissão

Dra. Maria do Carmo Both, Parque Zoológico
Membro da Comissão

Dra. Luisa Macedo Gomes de Braga, FEPPS
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela luz na minha caminhada e por todas as coisas boas que me cercam.

Ao meu amado marido Marcelo, pelo amor, carinho, cumplicidade e, principalmente, pela paciência nos momentos em que passei sem lhe dar a merecida atenção.

Um agradecimento especial aos meus pais, que me criaram, apoiaram minhas escolhas, e hoje se orgulham com as minhas conquistas.

Ao meu orientador, que eu admiro e respeito, prof. André Caríssimi, obrigada por todo conhecimento a mim transmitido desde a iniciação científica.

Agradeço imensamente aos colegas da Unidade de Experimentação Animal, Carol, Eduardo, Marta e Vera, que me apoiaram com força (carregando ovelhas!) durante a realização do experimento. Em especial agradeço à minha chefe, enfa. Marta Cioato, que está sempre disposta a ajudar no que for preciso.

Agradeço a minha querida estagiária Andrea Velasque, que perdeu parte das férias assistindo horas e mais horas de vídeos.

Ao Sr. Antônio Leotti, proprietário das ovelhas, pelo seu empenho em transportar os animais sempre no mesmo horário.

À professora Ender Oberst, pelo empréstimo da ovelha que desempenhou o papel de “desconhecida”.

À minha família e amigos, fonte de muita alegria e apoio, que longe ou perto estão sempre prontos para ajudar. Um agradecimento especial à Ivani e ao Stéfano, que muito me auxiliaram com seus conhecimentos estatísticos!

À UFRGS, que me acolhe desde o 2º grau como uma segunda casa, onde adquiri amizades e conhecimentos eternos.

Um agradecimento mais do que especial aos animais, em especial àqueles que, sem saber, salvam vidas.

*A mente que se abre a uma nova
idéia jamais voltará ao seu
tamanho original.*

Albert Einstein

RESUMO

Ovinos são modelo animal para diversas pesquisas biomédicas, além de serem estudados nas pesquisas zootécnicas e veterinárias. Em algumas circunstâncias experimentais as ovelhas necessitam ser alojadas sozinhas, sem contato social com coespecíficos. Como são altamente sociais, os ovinos ficam estressados com mudanças no seu ambiente social, especialmente com a separação do rebanho. Isso desencadeia uma série de respostas endócrinas e comportamentais, comprometendo o bem-estar do animal e possivelmente os resultados da pesquisa que está sendo realizada. Uma forma de minimizar esses efeitos é prover um ambiente mais estimulante, através de enriquecimento ambiental. O presente trabalho teve como objetivo verificar a influência do enriquecimento ambiental com espelhos, para ovinos mantidos isolados em ambiente novo, após estresse agudo causado pelo transporte. Vinte e quatro ovelhas foram divididas em quatro grupos: Grupo Espelho, no qual as ovelhas foram mantidas em isolamento social num ambiente enriquecido com um painel de espelho; Grupo OvCo e OvDes, no qual as ovelhas ficaram acompanhadas, respectivamente, de uma ovelha do mesmo rebanho e de um rebanho diferente; Grupo Isolado, no qual as ovelhas foram mantidas em isolamento social e sem enriquecimento ambiental. Cada ovelha foi transportada da propriedade de origem até o local do experimento, sempre no mesmo horário, onde permaneciam até o dia seguinte. Foram realizadas seis coletas de sangue para dosagem de cortisol: basal, na chegada ao local do experimento e duas, quatro, seis e 24 horas após a chegada. O comportamento dos animais foi registrado durante as primeiras 6 horas de permanência no local do experimento, através de uma microcâmera. Nas dosagens de cortisol não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Houve diferença estatística no momento da chegada, logo após o transporte, em todos os grupos. Observa-se uma tendência do declínio do cortisol nas primeiras duas horas ser mais acentuado no grupo OvCo, menos acentuado no grupo Isolado e os outros dois grupos apresentando valores intermediários. A análise comportamental não evidenciou diferença estatística nos parâmetros número de balidos, número de passos, tempo de interação com o enriquecimento ambiental, tempo de permanência deitada e tempo gasto se alimentando. A latência para iniciar a alimentação foi significativa ($P < 0,05$), sendo maior no grupo OvCo em relação ao OvDes e ao Espelho. O benefício do uso de espelhos como ferramenta de EA para a espécie ovina não ficou evidente no presente estudo para as condições que o mesmo foi executado.

Palavras-chave: ovino, cortisol, comportamento, etograma, enriquecimento ambiental.

ABSTRACT

Sheep are animal model for several biomedical research, in addition to being studied in agricultural and veterinary research. In some experimental conditions the sheep need to be housed alone, without social contact with conspecifics. Sheep, being highly social animals, are stressed by changes in their social environment, especially by the separation from the flock. As consequence, a series of endocrine and behavioral responses is triggered, compromising the welfare of the animal and possibly the research results. One way to minimize these effects is to provide a more stimulating environment, through environmental enrichment. This study aimed to verify the influence of environmental enrichment with mirrors for sheep kept isolated in the new environment, following acute stress caused by transportation. Twenty-four sheep were divided into four groups: Mirror Group, in which the sheep were kept in social isolation in an environment enriched with a panel mirror, OvCo and OvDes Groups, where the sheep were accompanied, respectively, by a sheep from the same flock and from a different flock, and the Isolated Group, in which the sheep were kept in social isolation, without environmental enrichment. Each sheep were transported from the farm to the location of the experiment, always at the same time, where they remained until the following day. Serum cortisol analysis were performed at six different time points: baseline, on arrival at the experiment site, and two, four, six and 24 hours after arrival. Animal behavior was recorded during the first 6 hours at the place of the experiment with a camera. Cortisol levels were not statistically different among groups. We observed an increase in cortisol levels at arrival time in all groups. There is a trend towards a faster reduction in cortisol levels in OvCo group, while the reduction seems to be slower in the Isolated sheep, and the other two groups having intermediate values. Behavioral analysis showed no statistical difference in the number of bleatings, number of steps, time of interaction with environmental enrichment, lying, and eating. The latency to start feeding was significant ($P < 0.05$), being higher in group OvCo in relation to OvDes and the Mirror groups. The benefit of using mirrors as a tool of environmental enrichment for the sheep was not evident in this study for the conditions that it was developed.

Keywords: sheep, cortisol, behavior, ethogram, environmental enrichment.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Média e desvio padrão da concentração plasmática de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), nos seis tempos avaliados.36
- Tabela 2 – Média e desvio padrão da porcentagem da concentração plasmática de cortisol dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), no tempo 2h comparado ao pico de cortisol (0h).38
- Tabela 3 – Média e desvio padrão da porcentagem da concentração plasmática de cortisol dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido) no tempo 24h comparado ao cortisol basal40
- Tabela 4 – Média e desvio padrão do número de passos dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), durante as seis horas de observação41
- Tabela 5 – Média e desvio padrão da porcentagem (%) de tempo interagindo com o enriquecimento ambiental (espelho, coespecífico ou nenhum enriquecimento) dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), durante as seis horas de observação.....41
- Tabela 6 – Média e desvio padrão da porcentagem (%) de tempo gasto na alimentação e da latência para iniciar a alimentação (min.) dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), durante as seis horas de observação42

- Tabela 7 – Porcentagem (%) de tempo de descanso de todos os animais dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), durante as seis horas de observação.....42
- Tabela 8 – Número de balidos de todos os animais dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), durante as seis horas de observação43
- Tabela 9 – Média \pm desvio padrão do consumo de ração (g) e de água (ml) dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), durante 24 horas de permanência no local do experimento44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Baia com o painel de espelho (A) e posição das baias no local do experimento, a seta (↘) indica a ovelha experimental (B).31
- Figura 2 – Imagem capturada do vídeo, mostrando apenas a ovelha experimental.33
- Figura 3 – Coleta basal do sangue na veia jugular (A), colocação do cateter na veia cefálica após a chegada na UEA (B) e posicionamento para coleta de sangue nos momentos duas, quatro, seis e 24 horas (C).....34
- Figura 4 – Curva da concentração plasmática de cortisol dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), nos seis tempos avaliados.37
- Figura 5 – Box Plot das porcentagens de concentração plasmática de cortisol do tempo 2h em relação ao tempo 0h dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido).....39

LISTA DE ABREVIATURAS

EA	Enriquecimento Ambiental
FC	Frequência Cardíaca
HPA	Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
CRH	Hormônio Liberador de Corticotropina
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
UEA	Unidade de Experimentação Animal
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
OvCo	Grupo com coespecífico do mesmo rebanho
OvDes	Grupo com coespecífico de rebanho diferente
ANOVA	Análise de Variância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Ovino como modelo animal	16
2.2	Características dos ovinos	17
2.3	Definição de estresse	18
2.3.1	O estresse em ovinos na experimentação animal.....	19
2.3.2	Como mensurar o estresse	21
2.3.2.1	Cortisol	21
2.3.2.2	Avaliação Comportamental	23
2.4	Enriquecimento ambiental	24
2.4.1	Uso de espelho	25
3	OBJETIVOS	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Animais	29
4.2	Desenho experimental	29
4.2.1	Grupo Espelho (<i>n</i> =6).....	30
4.2.2	Grupo OvCo (<i>n</i> =6)	30
4.2.3	Grupo OvDes (<i>n</i> =6).....	31
4.2.4	Grupo Isolado (<i>n</i> =6).....	31
4.3	Análise comportamental	32
4.4	Dosagem de Cortisol	33
4.5	Avaliação do consumo de alimento e água	34
4.6	Análise Estatística	35
5	RESULTADOS	36
5.1	Resultados da análise de cortisol plasmático	36
5.2	Resultados da análise de comportamento	40
5.3	Resultados da análise do consumo de alimento	43

6	DISCUSSÃO.....	45
6.1	Aspectos relacionados ao cortisol	45
6.2	Aspectos relacionados ao comportamento.....	48
6.3	Aspectos relacionados ao consumo de alimento	50
7	CONCLUSÕES	51
8	PERSPECTIVAS	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

A interação entre homens e animais sempre esteve presente na história da humanidade e as investigações na área da saúde utilizando animais de laboratório são realizadas há mais de dois mil anos. Contudo, a preocupação e o cuidado com o bem-estar desses animais só surgem no final do século 17, com as primeiras regulamentações da pesquisa com animais. As avaliações de bem-estar animal devem considerar as condições de alojamento, manejo, enriquecimento e socialização (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2008)

Dentre as espécies consideradas como animais de laboratório estão os ovinos, que por sua docilidade, tamanho e fácil manejo, vêm ganhando espaço na pesquisa biomédica e agropecuária. Quatro áreas da pesquisa com ovelhas se desenvolveram no século 20: estudos de zootecnia, incluindo nutrição, reprodução, produção, genética, doenças e propriedades da lã; a ovelha como modelo animal para procedimentos cirúrgicos e processos fisiológicos; estudos de biologia básica, como modelo metabólico para as áreas da nutrição, hematologia, imunologia e endocrinologia; estudos de cirurgia e fisiologia fetal (FRASER, 1995).

Muitos destes estudos requerem que a ovelha seja separada do seu rebanho e mantida em isolamento social. Os ovinos são animais gregários (HARGREAVES; HUTSON, 1997; CABOS, 2001; NOWAK *et al.*, 2008) e respondem ao isolamento com uma série de alterações comportamentais, endócrinas e fisiológicas (PRICE; THOS, 1980; NIEZGODA *et al.*, 1987; PARROTT; HOUP; MISSON, 1988; VAN-ADRICHEM; VOGT, 1993; COCKRAM *et al.*, 1994; BOUISSOU *et al.*, 1996; CARBAJAL; ORIHUELA, 2001; DOYLE *et al.*, 2010). Por isso, alternativas para minimizar esse estresse são estudadas, e uma delas é o enriquecimento ambiental (EA).

As condições de alojamento dos animais são essenciais ao seu bem-estar e à qualidade dos dados das pesquisas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996). O enriquecimento ambiental é um princípio na criação de animais que visa melhorar a qualidade dos cuidados em animais de cativeiro, identificando e fornecendo os estímulos

ambientais necessários para um ótimo bem-estar psicológico e fisiológico (SHEPHERDSON, 1998 *apud* COLEMAN, 2008).

Espelhos são uma alternativa prática e barata de EA de animais de cativeiro (YOUNG, 2003). As respostas comportamentais e fisiológicas causadas pela exposição a um painel de espelhos já foram estudadas em diversas espécies, como coelhos, camundongos, equinos, bovinos, ovinos e aves (PARROTT; HOUPPT; MISSON, 1988; PILLER; STOOKEY; WATTS, 1999; MILLS; DAVENPORT, 2002; SHERWIN, 2004; JONES; PHILLIPS, 2005; HENRY *et al.*, 2008; DALLE ZOTTE *et al.*, 2009; KAY; HALL, 2009). Com relação ao uso do espelho em ovinos, foi encontrado apenas um estudo, o qual constatou que esse tipo de enriquecimento foi apenas parcialmente efetivo na redução do estresse gerado pelo isolamento social (PARROTT; HOUPPT; MISSON, 1988). Esse estudo sugere que as ovelhas encaram a imagem do espelho como um indivíduo estranho e isso pode ser estressante.

Parrot (1988) ainda sugere que mais estudos são necessários para avaliar a importância de uma companhia familiar *versus* uma companhia desconhecida na amenização dos efeitos do estresse em ovelhas. Por isso, estruturamos nosso estudo de maneira que seja possível comparar as respostas de ovelhas expostas a um painel de espelho com as respostas de ovelhas mantidas com outra ovelha do mesmo rebanho ou de um rebanho diferente e ainda com respostas de ovelhas mantidas em total isolamento social.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ovino como modelo animal

Embora os roedores predominem como modelos animais em várias áreas da pesquisa científica, é cada vez mais evidente que outras espécies de animais, inclusive de grande porte, possam proporcionar oportunidades únicas para a investigação biomédica (SCHEERLINCK *et al.*, 2008).

Os Ovinos começaram a ser utilizados como animal de laboratório na metade do século 19, quando pesquisadores da área médica fizeram os primeiros experimentos nesta espécie (FRASER, 1995). Ovelhas são dóceis por natureza, tem grande tamanho, o que facilita a manipulação cirúrgica, e sua fisiologia é semelhante aos seres humanos. São utilizadas em diferentes estudos, como estudos hemodinâmicos, pelo fácil cateterismo, renais e musculares, investigação da fisiologia fetal e neonatal, doenças respiratórias, em especial a asma, desenvolvimento de vacinas e diversos modelos cirúrgicos (FRASER, 1995; CABOS, 2001; CARTER, 2007; BARRY; ANTHONY, 2008; SCHEERLINCK *et al.*, 2008; MEEUSEN *et al.*, 2010).

A partir de estudos conduzidos na metade do século 20, as ovelhas tornaram-se o modelo animal para fisiologia fetal mais amplamente aceito (HUGGETT; WIDDAS, 1951; CARTER, 1994). Barry e Anthony (2008) reconheceram que as ovelhas não são um modelo perfeito da gravidez humana, mas que há muitas características em comum, especialmente no desenvolvimento da placenta, na função metabólica e no transporte de nutrientes. Segundo Carter (2007), o que contribuiu para a popularidade da ovelha na pesquisa obstétrica é porque seu feto, a termo, pesa aproximadamente o mesmo que o feto humano. Além disso, é um animal de fácil manejo e quando está prenhe tolera procedimentos invasivos.

Ovinos com maturidade óssea estão rapidamente se tornando modelo animal para diversos problemas ortopédicos, sendo utilizados em cirurgias no ombro, estudos de fixação de fraturas e biocompatibilidade de biomateriais (NUNAMAKER, 1998; NUSS *et al.*, 2006; PEARCE *et al.*, 2007; TURNER, 2007). O número de cães ainda supera o

número de ovelhas na pesquisa ortopédica, no entanto o número de ovelhas vem aumentando na última década, o que pode estar relacionado a questões éticas, pela percepção pública negativa do uso de animais de companhia em pesquisa médica (PEARCE *et al.*, 2007).

Em alguns aspectos, os ovinos são mais relacionados aos seres humanos do que os roedores, resultando em fortes homologias de estruturas de proteínas, fatores de crescimento e mediadores. Com o recente sequenciamento do genoma bovino (> 95% de similaridade) e a disponibilidade de *microarrays* bovinos/ovinos, os modelos de doenças respiratórias em ovelhas também podem se tornar meios valiosos para a análise molecular detalhada e descoberta de drogas (MEEUSEN *et al.*, 2010).

2.2 Características dos ovinos

As ovelhas são animais gregários, que sentem-se melhor livres e agrupadas, do que isoladas (CABOS, 2001). As características mais importantes no seu comportamento são a sociabilidade, observada no modo como elas seguem umas às outras e mantêm-se reunidas, e a formação de vínculo entre a mãe e cordeiro (HARGREAVES; HUTSON, 1997; NOWAK *et al.*, 2008). Por isso, ficam estressadas com mudanças no seu ambiente social e, particularmente, pela separação do rebanho (PARROTT; HOUPPT; MISSON, 1988; BOUISSOU *et al.*, 1996; HARGREAVES; HUTSON, 1997), podendo se agitar e vocalizar bastante (NOWAK *et al.*, 2008).

Da Costa *et al.* (2004), demonstrou que a visão da imagem de um rosto familiar em comparação com imagens de um caprino ou de um triângulo invertido reduziu significativamente o comportamento relacionado ao estresse (atividade locomotora e vocalização) e os índices de estresse (frequência cardíaca, cortisol e adrenalina) de ovelhas mantidas em isolamento social. Cordeiros Romanov e Ile-de-France são capazes de responder diferentemente a imagens de outros cordeiros da mesma raça ou de raça diferente, sendo que a visão de imagens de animais da mesma raça foi associada com menor reação de medo (BOUISSOU *et al.*, 1996). Por outro lado, como são capazes de distinguir estados emocionais nas fotos, as ovelhas preferem a imagem de um rosto sereno

de um indivíduo de outra espécie a uma imagem de um coespecífico estressado (TATE *et al.*, 2006).

Os ovinos são animais predominantemente visuais, a extensão de seu campo de visão é 270-280°, o que permite aos indivíduos manterem relações espaciais com os animais, não só a sua frente, mas também por trás deles (NOWAK *et al.*, 2008). Assim como os humanos e os primatas não humanos, os ovinos têm uma sofisticada habilidade de reconhecimento social usando características visuais da face (DA COSTA *et al.*, 2004), sendo capazes de distinguir rostos de membros da sua própria raça dos de diferentes espécies e raças, além de distinguir entre os rostos de machos e fêmeas da mesma raça (KENDRICK *et al.*, 1995; BOUISSOU *et al.*, 1996).

Os ovinos têm uma sensibilidade auditiva semelhante a dos seres humanos (cerca de 10 dB), com uma faixa de 125 Hz a 42 KHz, ligeiramente superior a dos humanos (20 KHz) e apenas marginalmente inferior a dos cães (50 KHz) (KENDRICK, 2008). A vocalização ocorre apenas em alguns contextos sociais específicos, como no acasalamento, no isolamento e na separação da ovelha e seu cordeiro (HARGREAVES; HUTSON, 1997).

A comunicação sonora inclui balidos graves, observados entre a mãe e seu cordeiro ou no cortejo do macho com a fêmea, e balidos agudos, emitidos quando mãe e filho são separados ou quando o animal é isolado do seu grupo social (NOWAK *et al.*, 2008). Esse isolamento social também causa aumento no número de balidos (PRICE; THOS, 1980; CARBAJAL; ORIHUELA, 2001; DA COSTA *et al.*, 2004; DOYLE *et al.*, 2010).

2.3 Definição de estresse

O estresse é o efeito produzido por eventos externos (físicos ou ambientais) ou fatores internos (fisiológicos ou psicológicos), referidos como estressores, que induzem uma alteração no equilíbrio biológico de um animal (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996; 2008). O estresse é parte da vida e não é inerentemente prejudicial (MOBERG, 2000), porém o estresse experimentado pelos animais na pesquisa científica é uma variável difícil de ser controlada (PEKOW, 2005).

As respostas aos estressores frequentemente envolvem alterações fisiológicas, psicológicas e comportamentais. Dependendo do custo biológico necessário para a adaptação, o estresse pode afetar o bem-estar (MOBERG, 2000; PEKOW, 2005). Existem evidências que animais de laboratório cujo bem-estar está comprometido são fisiológica e imunologicamente anormais, e que quando utilizados em experimentos podem levar à obtenção de conclusões não confiáveis (POOLE, 1997).

2.3.1 O estresse em ovinos na experimentação animal

Ovinos são bem adaptados, comportamental e fisiologicamente, a ambientes extremos, capazes de lidar com situações adversas. Em condições artificiais, como o transporte, essa capacidade de adaptação pode mascarar o sofrimento do animal, tornando difícil avaliar seu bem-estar (DWYER; LAWRENCE, 2008).

O estresse agudo do transporte pode alterar importantes medidas psicofisiológicas, podendo afetar os resultados da pesquisa, se esta for realizada antes que essas medidas se normalizem (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2006; OBERNIER; BALDWIN, 2006). Os animais quando transportados devem passar por um período de adaptação fisiológica, psicológica e nutricional antes do início do experimento (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996; OBERNIER; BALDWIN, 2006).

Baldock e Sibly (1990) demonstraram que ovelhas transportadas apresentaram um aumento na frequência cardíaca (FC) em comparação com ovelhas mantidas no mesmo veículo estacionado. Broom *et al* (1996), que não observou diferenças na FC entre animais transportados ou mantidos em veículo estacionado, constatou que o cortisol, a prolactina e o hematócrito foram diferentes entre os grupos. O início do transporte causou um pico na concentração de cortisol, que se manteve elevado durante três horas quando comparado com o grupo de ovelhas não transportadas (BROOM *et al.*, 1996). Cockram *et al* (2000) também verificaram a ocorrência de um pico de cortisol no início do transporte. Obernier e Baldwin (2006) destacam que os pesquisadores devem prever se os parâmetros afetados

pelo transporte influenciam nos experimentos e em quanto tempo essas alterações são normalizadas, para definir o tempo necessário para a aclimatização.

Ovinos são animais gregários e altamente sociais, por isso outro fator de estresse é a separação do rebanho e o isolamento (PARROTT; HOUPPT; MISSON, 1988; BALDOCK; SIBLY, 1990). Os animais são isolados em situações específicas, como na quarentena, quando em tratamento em hospitais veterinários, em gaiolas metabólicas ou baias individuais para procedimentos experimentais, e nessas situações é provável que tenham um comprometimento do bem-estar por falta de companhia social (NOWAK *et al.*, 2008). Baldock e Sibly (1990) demonstraram que o isolamento social causa aumento da atividade, da vocalização e da frequência cardíaca, enquanto o isolamento espacial (com contato visual) não afetou esses parâmetros. No estudo de Carbajal e Orihuela (2001), ovelhas foram separadas do rebanho em duplas e apresentaram resultados semelhantes aos das ovelhas controle, não separadas do rebanho. Eles concluem que o bem-estar da ovelha melhora se elas forem separadas do rebanho em grupos de no mínimo dois animais.

Cockram *et al.* (1994) observou alterações nos leucócitos de ovelhas isoladas, sugerindo que elas podem ficar mais suscetíveis a algumas infecções por um período limitado. Em outro estudo, ovelhas isoladas do rebanho por vinte minutos tiveram aumento da frequência respiratória, da concentração de cortisol no soro, da atividade locomotora, da vocalização e da micção (CARBAJAL e ORIHUELA, 2001). Van Adrichem e Vogt (1992) verificaram os efeitos metabólicos do isolamento, observando redução da digestão e ineficiência na utilização da energia da dieta. A contenção, através do manejo das patas, associada ao isolamento causou uma forte resposta fisiológica, através do aumento sustentado da concentração plasmática do cortisol e alterações nos neutrófilos e linfócitos em ovelhas submetidas a esse modelo de estresse (DOYLE *et al.*, 2010).

Outras práticas de manejo estão associadas ao estresse, como o alojamento com animais desconhecidos, a exposição a ambientes desconhecidos, desidratação, estresse térmico, privação de alimento, os riscos de danos físicos (DWYER; LAWRENCE, 2008), bem como os possíveis estressores inerentes ao próprio procedimento experimental (por exemplo, dor, medo, imprevisibilidade, etc.).

2.3.2 Como mensurar o estresse

Para identificar os problemas de bem-estar é preciso ter meios para avaliar se um animal está demonstrando sinais de funcionamento biológico alterado, se pode expressar comportamento natural e/ou se está experimentando estados emocionais negativos (DWYER; LAWRENCE, 2008). É importante ressaltar que nenhum parâmetro isoladamente pode servir como um teste decisivo para o estresse e o diagnóstico baseado em uma única mensuração pode ser enganoso (COOK *et al.*, 2000; MOBERG, 2000; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2008).

Experimentalmente, as mensurações de estresse podem ser divididas em comportamentais, fisiológicas e de quantificação da produção (DWYER; LAWRENCE, 2008). Em ovinos, diversos parâmetros podem ser avaliados: metabolismo digestivo (VAN-ADRICHEM; VOGT, 1993), glicose (NIEZGODA *et al.*, 1987), prolactina (PARROTT; HOUPPT; MISSON, 1988; COCKRAM *et al.*, 1994), frequência cardíaca (BALDOCK; SIBLY, 1990; PALESTRINI *et al.*, 1998; DA COSTA *et al.*, 2004), imunidade (COCKRAM *et al.*, 1994), comportamento (PRICE; THOS, 1980; PARROTT; HOUPPT; MISSON, 1988; BALDOCK; SIBLY, 1990; COCKRAM *et al.*, 1994; BOUISSOU *et al.*, 1996; CARBAJAL; ORIHUELA, 2001; DA COSTA *et al.*, 2004) e cortisol, considerado o principal parâmetro (PRICE; THOS, 1980; NIEZGODA *et al.*, 1987; PARROTT; HOUPPT; MISSON, 1988; BALDOCK; SIBLY, 1990; COCKRAM *et al.*, 1994; BOUISSOU *et al.*, 1996; CARBAJAL; ORIHUELA, 2001; DA COSTA *et al.*, 2004).

2.3.2.1 Cortisol

A glândula adrenal tem um papel chave nas reações hormonais do estresse, envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e o sistema simpato-adrenomedular (MOBERG, 2000). Um hormônio chamado hormônio liberador da corticotropina (CRH) é liberado do hipotálamo e vai até a hipófise anterior, onde provoca a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que atua no córtex adrenal para produzir os glicocorticóides esteróides (cortisol em ovinos). Essa cascata neuroendócrina, disparada pelo hipotálamo em

resposta a alguma perturbação, seja externa, como a aproximação de um predador, ou interna, como o medo, prepara o corpo para uma resposta de luta ou fuga (DWYER; LAWRENCE, 2008).

Os hormônios secretados a partir do eixo HHA têm um efeito amplo e duradouro sobre o corpo. Praticamente todas as funções biológicas que são afetadas pelo estresse, incluindo a competência imunológica, reprodução, metabolismo e o comportamento, são reguladas por esses hormônios (MATTERI; CARROLL; DYER, 2000). Essas respostas endócrinas objetivam melhorar a aptidão do indivíduo frente ao estresse (MOSTL; PALME, 2002). Dos glicocorticóides de natural ocorrência no organismo, o cortisol é o mais potente (MEIJ; MOL, 2008).

A manutenção de concentrações suficientes, mas não excessivas, de glicocorticóides é necessária a fim de manter a homeostase (MATTERI; CARROLL; DYER, 2000). Na ausência de estresse, a concentração plasmática do cortisol em animais saudáveis varia dentro de certos limites, embora a secreção não ocorra ao longo do dia, e sim em pulsos (MEIJ; MOL, 2008). Essa concentração reconhecidamente sofre considerável variação, sendo afetada pela raça, idade, experiência, estado fisiológico (ciclo estral, prenhez, etc) e sexo (DWYER; LAWRENCE, 2008; MEIJ; MOL, 2008). A média \pm desvio padrão do cortisol ovino é $2,24 \pm 0,36 \mu\text{g/dL}$.¹

Independente dessas variações fisiológicas, é nítido que o estresse pode ativar o sistema hipófise-adrenocortical (MEIJ; MOL, 2008). As respostas dessa cascata neuroendócrina podem ser avaliadas indiretamente pela monitoração das quantidades de cortisol em fluidos corporais (sangue, saliva, leite, urina, etc) (DWYER; LAWRENCE, 2008). O estresse associado ao manejo e contenção dos animais na coleta de sangue pode, por si só, ativar o eixo HHA e confundir os resultados (COOK *et al.*, 2000). No entanto, formas não invasivas de coleta também apresentam desvantagens: saliva e urina também necessitam de manipulação do animal, o leite é limitado a animais lactantes e as fezes refletem a produção de um período de tempo (10-12 horas em ruminantes), não sendo capaz de detectar picos de concentração (MOSTL; PALME, 2002).

¹ Fonte: KANEKO, J.J., HARVEY, J.W. E BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 6th ed. (Appendix VIII: Blood Analyte Reference Values in Large Animals).

O cortisol, em condições experimentais controladas, é um indicador confiável do estresse (MOBERG, 2000). Entretanto, é necessário ressaltar que a concentração de cortisol também se eleva em momentos de muita excitação, quando o animal pode estar experimentando emoções positivas, e não exclusivamente restrito a estados emocionais negativos. Assim, a elevação do cortisol não pode ser sempre interpretada como um sintoma do declínio do bem-estar animal, sem que evidências comportamentais e psicológicas apoiem essa constatação (DWYER; LAWRENCE, 2008; MEIJ; MOL, 2008).

2.3.2.2 Avaliação Comportamental

Através da avaliação comportamental é possível obter dados comportamentais para correlacioná-los com os resultados de respostas fisiológicas e determinar, por exemplo, se a concentração de cortisol aumentou por um estado emocional positivo ou negativo. No entanto, é preciso ter cautela na interpretação, pois nem sempre os dados se correlacionam (DWYER; LAWRENCE, 2008).

As alterações na atividade e no número de vocalizações dos ovinos são dois parâmetros comumente observados nos estudos, pela facilidade de obtenção desses dados (PARROTT; HOUP; MISSON, 1988; BALDOCK; SIBLY, 1990; COCKRAM *et al.*, 1994; BOUISSOU *et al.*, 1996; CARBAJAL; ORIHUELA, 2001; DA COSTA *et al.*, 2004). Quando socialmente isolados, ovinos inicialmente apresentam um aumento da atividade e das vocalizações, seguidos por um aumento do tempo de descanso, que pode ser acompanhado pela redução da ingestão de alimentos e água, se o isolamento é prolongado (NOWAK *et al.*, 2008).

Estudos sobre algum tipo de alteração no ambiente, como o enriquecimento ambiental, avaliam a interação do ovino com esse objeto através do tempo que o animal fica olhando para ele e do tempo que o animal passa no quadrante próximo ao objeto (PARROTT; HOUP; MISSON, 1988; BOUISSOU *et al.*, 1996; DA COSTA *et al.*, 2004).

Outra forma de pesquisar o comportamento de ovinos é através de testes de aversão e preferência, nos quais o animal mostra o que ele quer e como se sente, ao invés de confiarmos apenas na interpretação do comportamento expresso (DWYER; LAWRENCE,

2008). Um exemplo são os estudos descritos por Tate *et al* (2006) que demonstram que ovelhas preferem visualizar rostos de coespecíficos familiares ou rostos com expressão serena.

2.4 Enriquecimento ambiental

Os alojamentos de animais de pesquisa são, muitas vezes, intencionalmente providos de elementos básicos, para que os sujeitos da pesquisa sejam padronizados, ou seja, livre das diferenças que poderiam influenciar os resultados de formas diferentes (REINHARDT, 2004).

Um programa de manejo para animais de experimentação deve prover ambiente e cuidados adequados, de modo a possibilitar aos animais um crescimento, desenvolvimento e reprodução normais, assim como saúde e bem-estar adequados, minimizando o impacto das variáveis que podem afetar os resultados de pesquisas (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1996).

Como ambientes vazios podem não satisfazer as necessidades espécie-específicas dos animais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2008), uma das alternativas para promover um comportamento sadio aos animais é através de técnicas de EA. Segundo Boere (2001), o enriquecimento ambiental é um conjunto de técnicas que modificam o ambiente, melhorando a qualidade de vida dos animais ao satisfazer suas necessidades comportamentais. O EA pode, assim, melhorar o bem-estar, reduzir o estresse e melhorar a qualidade dos dados obtidos com os animais, desde que esse enriquecimento não interfira nos resultados da pesquisa (COLEMAN, 2008; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2008).

Enriquecimento ambiental é um conceito que descreve como os ambientes de animais em cativeiro podem ser alterados para o benefício dos seus habitantes (YOUNG, 2003). Newberry (1995) define EA como uma melhoria nas funções biológicas dos animais de cativeiro, resultante das modificações no ambiente. Ela ainda destaca que o conceito de enriquecimento ambiental é vago e que alguns autores aplicam o termo aos tipos de

modificações ambientais, sem qualquer evidência de que houve melhoria para os animais. Embora as definições variem, a ênfase em comum é sobre prover um ambiente mais estimulante (WEED; RABER, 2005).

A pesquisa aplicada na área do EA, para animais de laboratório, data do início dos anos 80 (OLSSON *et al.*, 2003), década em que a literatura para enriquecimento de primatas não humanos aumentou consideravelmente (BLOOMSMITH; BRENT; SCHAPIRO, 1991). No entanto, Appleby (1995) chamou atenção para a carência de publicações sobre EA para animais de produção utilizados em pesquisas. Atualmente, o fornecimento de EA para os animais de pesquisa não é uma opção, e sim uma exigência das agências reguladoras da pesquisa em muitos países (COLEMAN, 2008), mas não no Brasil.

Bloomsmith *et al.* (1991) descreve diversas opções de EA para primatas não humanos, dividindo-as em cinco categorias principais: social, física, alimentar, ocupacional e sensorial. Muitas técnicas que têm sido desenvolvidas para outras espécies, como primatas não humanos, poderiam ser aplicadas para animais de produção (APPLEBY, 1995). As opções de EA não atraem igualmente a todas as espécies e o ideal para animais de laboratório seria fornecer múltiplas formas de enriquecimento (COLEMAN, 2008). Muitos estudos têm sido conduzidos para avaliar a eficácia do EA, e fica claro que alguns tipos de enriquecimento alteram o comportamento mais efetivamente que outros (TAROU; BASHAW, 2007).

2.4.1 Uso de espelho

Ao longo dos anos, estudos têm explorado os efeitos dos diferentes tipos de enriquecimento no bem-estar de uma grande variedade de espécies e, mais recentemente, o impacto da estimulação sensorial (por exemplo, visão e olfato) também tem sido explorada (WELLS, 2009). Espelhos podem enriquecer o ambiente de alguns animais sociais mantidos em isolamento (JONES; PHILLIPS, 2005), suprimindo a falta do estímulo visual de um coespecífico (PARROTT; HOUP; MISSON, 1988), além de serem uma das soluções mais baratas de contato visual não animal e não humano (YOUNG, 2003). Em situações onde animais têm que ser manejados individualmente, modificações ambientais, tais como

o reflexo da imagem em um espelho, podem ser usadas para reduzir o estresse do isolamento (PILLER; STOOKEY; WATTS, 1999).

Espelhos têm sido utilizados rotineiramente, por muitos anos, em aves de estimação mantidas em gaiolas, mas têm sido recentemente investigados mais sistematicamente (SHERWIN, 2004). Também podem ser uma boa maneira de reduzir o estresse relacionado com o isolamento de aves de laboratório (HENRY *et al.*, 2008). Piller, Stookey, Watts (1999) demonstraram que a utilização de espelho em novilhas isoladas reduziu a frequência cardíaca destas em relação às novilhas sem espelho. Para cavalos estabulados mantidos isolados, o espelho simula o contato visual com coespecíficos e promove distração ambiental, reduzindo o comportamento estereotipado “*weaving*”, que é o balanço lateral da cabeça. (MCAFEE; MILLS; COOPER, 2002; MILLS; DAVENPORT, 2002).

Em coelhos, o espelho causa inicialmente uma reação de alerta, provavelmente por perceberem como uma ameaça. Num segundo momento, os coelhos passam a investigar o espelho, aumentando a complexidade do seu comportamento (JONES; PHILLIPS, 2005). Ao realizar um teste de preferência com coelhos isolados e em grupo, no qual os animais podiam escolher se preferiam ficar em uma gaiola revestida de espelhos ou em uma gaiola revestida com plástico, Dalle Zotte *et al* (2009) observaram que os animais preferiram ficar e comer na gaiola espelhada, passando maior parte do tempo nesse ambiente. No entanto, Sherwin (2004) ao realizar um teste semelhante com camundongos isolados, concluiu que os espelhos não são apropriados como EA para essa espécie, quando alojada individualmente.

O uso de espelho tem sido cogitado como uma forma de EA para ovelhas, em função das características do comportamento ovino, já citadas anteriormente. A presença de painéis de espelhos durante o isolamento atraiu a atenção das ovelhas e reduziu a magnitude das respostas endócrinas e fisiológicas (PARROTT; HOUPY; MISSON, 1988). Os autores desse estudo concluíram que os espelhos foram apenas parcialmente efetivos como substitutos de outro animal. Eles justificaram, com base em seu estudo anterior, que a ovelha interpreta o seu reflexo como um estranho e isso pode ser estressante (PARROTT, 1983) e, por essa razão, o espelho não compensaria completamente a ausência de um coespecífico.

Jones e Phillips (2005) testaram coelhos submetidos a quatro diferentes enriquecimentos ambientais: um coespecífico, um animal de brinquedo, um espelho e um painel branco. As respostas dos coelhos aos espelhos foram mais similares às respostas ao brinquedo e ao painel branco que às do coespecífico, mostrando que o espelho não substitui a presença de um coelho. Já no estudo de Dalle Zotte *et al* (2009) os coelhos isolados preferiram a gaiola espelhada, demonstrando que esse enriquecimento serve como um substituto parcial de um coespecífico, como concluído por Parrot, Houpt e Misson (1988).

As pesquisas com EA com espelhos geram diferentes resultados, por isso, mais estudos são necessários na espécie ovina, para avaliar a preferência por espelhos, como foi feito por Dalle Zotte *et al* (2009), e para avaliar a importância de uma companhia familiar versus uma estranha, como sugerem Parrot, Houpt e Misson (1988).

3 OBJETIVOS

3.1 Gerais: verificar a influência do enriquecimento ambiental com espelhos para ovinos mantidos isolados em ambiente novo, após estresse agudo causado pelo transporte.

3.2 Específicos:

- Verificar a influência do enriquecimento com espelhos no comportamento dos animais.
- Verificar a influência do enriquecimento com espelhos no cortisol sanguíneo.
- Verificar se o uso de espelhos simula a presença de um coespecífico, através da comparação com a presença de um animal conhecido e da comparação com um animal desconhecido.
- Verificar o efeito do transporte na concentração plasmática de cortisol.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esse estudo foi conduzido na Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UEA/HCPA), localizada no hemisfério sul (30°05'S, 51°10'W), durante os meses de novembro e dezembro. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, sob o número 09-071.

4.1 Animais

Vinte e quatro ovelhas adultas, com idade entre um e dois anos, não prenhes e não lactantes, da raça Corriedale, foram aleatoriamente distribuídas em 4 grupos experimentais. Todos os animais eram identificados com brincos numerados. Duas ovelhas adicionais foram utilizadas, sendo uma oriunda do mesmo rebanho das ovelhas experimentais (“ovelha conhecida”) e outra cedida pela Faculdade de Veterinária da UFRGS (“ovelha desconhecida”), ambas adultas (4 anos) da raça Texel.

As 24 ovelhas experimentais foram mantidas a campo, no mesmo rebanho, durante todo estudo, juntamente com a ovelha chamada “conhecida”, em uma propriedade rural no município de Nova Santa Rita-RS. Os animais não foram submetidos a algum tipo de manejo especial. A alimentação era à base de pastagem e ração.

O cálculo do tamanho da amostra foi baseado nas diferenças de cortisol entre os grupos do estudo de Parrot, Houpt e Misson (1988), utilizando um nível de significância de 5% e um poder estatístico de 90% para medidas repetidas.

4.2 Desenho experimental

A rotina experimental foi igual para todos os grupos. Cada ovelha foi separada do rebanho e transportada até o local do experimento, distante 50km (40 minutos de viagem), sempre no mesmo horário, às 8:30 da manhã. O transporte de uma ou duas ovelhas (conforme o grupo a qual pertenciam) era realizado uma vez ao dia. Na UEA/HCPA, a ovelha experimental foi alojada em uma baia medindo 150 cm x 110 cm, em sala

climatizada ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$), com ciclo de luz controlado (7:00–19:00) e livre acesso à água, ração fornecida pelo produtor rural e feno de alfafa. As ovelhas “conhecida” e “desconhecida” foram mantidas na mesma sala, na baia localizada em frente à baia da ovelha experimental, com a mesma alimentação. Cada ovelha experimental permaneceu um dia na UEA/HCPA. A ordem dos grupos foi randomizada, para minimizar efeitos ambientais (calor, chuva, etc) e para facilitar a logística do experimento.

4.2.1 Grupo Espelho ($n=6$)

No grupo Espelho, cada uma das seis ovelhas experimentais foi transportada e alojada sozinha. Nesse grupo foi empregada a técnica de enriquecimento ambiental por estimulação sensorial (visão). Na baia localizada em frente à baia experimental, foi colocado um painel de espelho (150cm x 99cm), com o objetivo de simular uma companhia a ovelha sozinha (Figura 1A).

4.2.2 Grupo OvCo ($n=6$)

Para comparar os resultados obtidos com o espelho, se simulam ou não a presença de outra ovelha, utilizou-se a técnica de enriquecimento por interação social. Assim, esse grupo foi composto pelas seis ovelhas experimentais e uma ovelha considerada um coespecífico conhecido, oriunda do mesmo rebanho. Essa ovelha foi sempre a mesma e foi indicada pelo produtor rural como a ovelha alfa daquele rebanho, aquela que as outras ovelhas seguem. A ovelha experimental OvCo1 foi transportada junto com a ovelha conhecida. No dia seguinte, a ovelha OvCo2 foi levada até a UEA/HCPA e a OvCo1 retornou à propriedade, enquanto a ovelha conhecida permaneceu no local do experimento. E no outro dia as duas retornaram à propriedade. Essa logística foi repetida três vezes, de modo que três ovelhas foram transportadas em duplas e três foram transportadas sozinhas. Assim, minimiza-se o fator companhia no transporte, que poderia reduzir o estresse. Na UEA/HCPA, a ovelha “conhecida” foi mantida na baia da frente da ovelha experimental, no mesmo local onde foi colocado o painel de espelho (Figura 1B).

4.2.3 Grupo OvDes ($n=6$)

Nesse grupo também foi utilizado o EA por interação social, no entanto a ovelha era proveniente de um rebanho diferente do rebanho das ovelhas experimentais, considerada um coespecífico desconhecido. Essa ovelha pertencia à Faculdade de Veterinária da UFRGS e foi levada duas vezes até a UEA/HCPA, onde permaneceu três dias. As ovelhas experimentais foram transportadas sozinhas, uma de cada vez. A ovelha desconhecida também era alojada na baia em frente à ovelha experimental.

4.2.4 Grupo Isolado ($n=6$)

Nesse grupo cada ovelha experimental era transportada e alojada sozinha, sem qualquer tipo de EA.

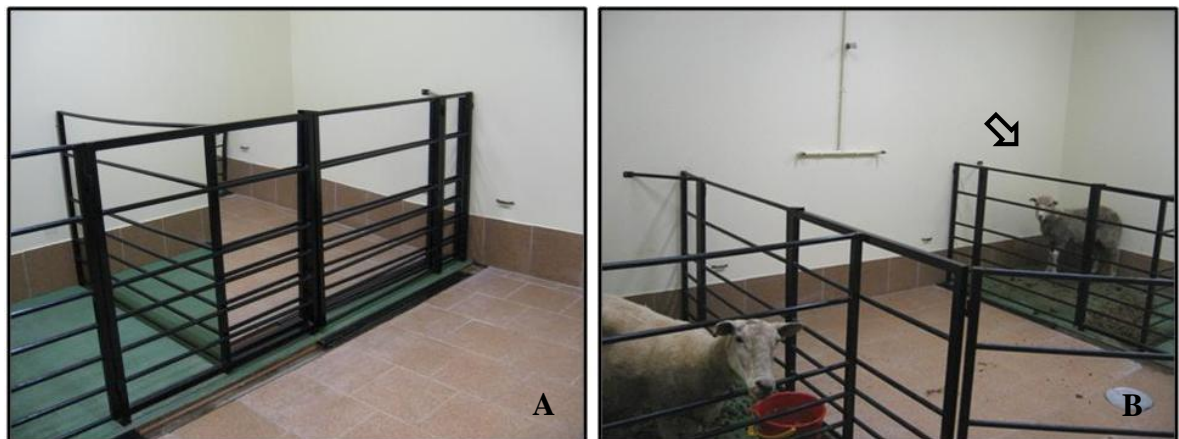


Figura 1 – Baia com o painel de espelho (A) e posição das baias no local do experimento, a seta (↷) indica a ovelha experimental (B).

4.3 Análise comportamental

O comportamento dos animais foi registrado durante as primeiras seis horas de permanência no local do experimento, através de micro câmera colorida com áudio (modelo PT400 – Protection[®]). Optou-se por registrar somente seis horas para que a avaliação integral do vídeo pudesse ser realizada (144 horas de filmagem). As imagens foram gravadas em computador para posterior registro do etograma, que consiste de uma planilha contendo o repertório de comportamentos típicos e atípicos da espécie.

Os seguintes comportamentos foram observados:

- Tempo de interação com o espelho ou com os coespecíficos: foi considerado o tempo que o animal passava olhando em direção à baía da frente. Esse é o comportamento mais importante do estudo, pois reflete o quanto o EA chama a atenção do animal. No caso do grupo Isolado, foi registrado da mesma forma, servindo como parâmetro de comparação, para mostrar o quanto o animal olha ao acaso naquela direção.
- Tempo gasto ingerindo água e alimento: foi considerado o tempo que o animal estava próximo ao alimento/água, ingerindo ou investigando.
- Tempo de descanso: foi considerado quando o animal estava deitado.
- Número de balidos: foram contados os balidos da ovelha experimental, observando o movimento da boca se houvessem balidos da outra ovelha, nos grupos OvCo e OvDes.
- Número de passos: foi estabelecido um passo quando a ovelha movimentasse o membro anterior que não estava com o cateter intravenoso.
- Comportamentos agressivos: foram registradas as tentativas de fuga e cabeçadas na grade.

Todos os vídeos foram analisados pelo mesmo observador, que desconhecia a qual grupo pertencia a ovelha, pois as imagens mostravam somente a baía da ovelha experimental (Figura 2). Foi descontado um minuto logo após a colocação da ovelha na baía e após as intervenções para a coleta de sangue.



Figura 2 – Imagem capturada do vídeo, mostrando apenas a ovelha experimental.

4.4 Dosagem de Cortisol

A análise da concentração de cortisol no soro foi realizada no Serviço de Patologia Clínica, Unidade de Bioquímica, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As dosagens foram feitas por eletroquimioluminescência, com kit da Roche[®], de uso da rotina do laboratório. A sensibilidade é de 0,5 nmol a 1750 nmol e a sensibilidade para amostras de soro ovino foi previamente testada.

As amostras foram obtidas em seis momentos. A primeira coleta foi realizada ainda no local de origem das ovelhas, através de punção da veia jugular (Figura 3A). Essa foi considerada a amostra basal. A segunda coleta foi realizada na chegada da ovelha ao local do experimento. Nesse momento, foi introduzido um cateter 20G na veia cefálica (Figura 3B), para facilitar as coletas posteriores e minimizar o estresse do animal. As demais coletas foram duas, quatro, seis e 24 horas após o início da observação (Figura 3C). Todas as amostras eram centrifugadas por 10 minutos (4000 rpm) e o soro era separado e mantido em refrigeração até a análise.



Figura 3 – Coleta basal do sangue na veia jugular (A), colocação do cateter na veia cefálica após a chegada na UEA (B) e posicionamento para coleta de sangue nos momentos duas, quatro, seis e 24 horas (C).

4.5 Avaliação do consumo de alimento e água

A ração e a água oferecida às ovelhas foram mensuradas no início e ao final do experimento, para avaliação do consumo. A ração foi pesada numa balança eletrônica de precisão (Marte AS5500[®]) e a água foi medida através de uma proveta. Sempre que fosse necessário, era feita a reposição do alimento. Também foi oferecido feno de alfafa, no entanto, como esse alimento não era familiar às ovelhas, elas praticamente não o consumiram e por isso ele não foi pesado.

4.6 Análise Estatística

A análise descritiva foi apresentada através de média e desvio-padrão. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade das medidas de cortisol.

A análise de variâncias (ANOVA) para medidas repetidas foi utilizada para comparar os valores de cortisol ao longo de todo o processo entre os diferentes grupos. Foram considerados significantes os valores de $P < 0,05$.

Outras testagens foram realizadas, como Teste t para amostras independentes para a variável cortisol, teste de regressão para confirmar tendência, teste de correlação de Pearson, para avaliar a relação entre o pico do cortisol e o tempo de descanso, e Kruskal-wallis com teste de Dunn para comparar o cortisol do tempo 24h com o basal.

Foi descartado o valor de cortisol de uma ovelha do grupo Espelho no tempo 24h. Segundo critérios estatísticos, esse valor ($12,60\mu\text{g/dL}$) está em uma faixa de observação pouco comum (Escore $z=9,52$).

5 RESULTADOS

5.1 Resultados da análise de cortisol plasmático

A média e o desvio padrão da concentração plasmática basal de cortisol foi de $1,95 \pm 1,10 \mu\text{g/dL}$. Os valores médios do cortisol plasmático estão apresentados na tabela 1. Os resultados referem-se aos seis tempos de coleta: no local de origem (basal), na chegada ao local do experimento (0h) e nas horas subseqüentes (2h, 4h, 6h e 24h). Houve diferença estatística significativa nos valores médios do cortisol plasmático do tempo 0h para os demais tempos, em todos os grupos, com um aumento médio de 248% (mínimo=26% e máximo=1032%, desvio padrão=226%). Não se observou diferença estatística significativa entre os grupos em nenhum tempo avaliado. A figura 4 mostra a evolução da concentração plasmática do cortisol nos tempos coletados.

Tabela 1 – Média e desvio padrão da concentração plasmática de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), nos seis tempos avaliados.

Grupo	<i>n</i>	Basal	0h	2h	4h	6h	24h
Isolado	6	$1,94 \pm 0,73^a$	$5,19 \pm 1,64^b$	$3,05 \pm 2,14^a$	$2,45 \pm 1,91^a$	$1,94 \pm 1,42^a$	$2,05 \pm 1,59^a$
Espelho	6	$2,30 \pm 1,28^a$	$6,62 \pm 2,68^b$	$2,65 \pm 0,67^a$	$2,20 \pm 0,77^a$	$1,48 \pm 0,62^a$	$1,65 \pm 1,15^a$
OvDes	6	$1,19 \pm 0,42^a$	$5,20 \pm 1,60^b$	$2,19 \pm 0,54^a$	$1,40 \pm 0,62^a$	$1,08 \pm 0,49^a$	$1,98 \pm 0,68^a$
OvCo	6	$2,35 \pm 1,47^a$	$4,92 \pm 2,73^b$	$1,53 \pm 1,45^a$	$1,21 \pm 0,57^a$	$1,75 \pm 0,94^a$	$1,89 \pm 1,48^a$

Médias nas linhas, seguidas de letras diferentes (*a,b*), diferem significativamente entre si, para o teste de Tukey ($P < 0,05$).

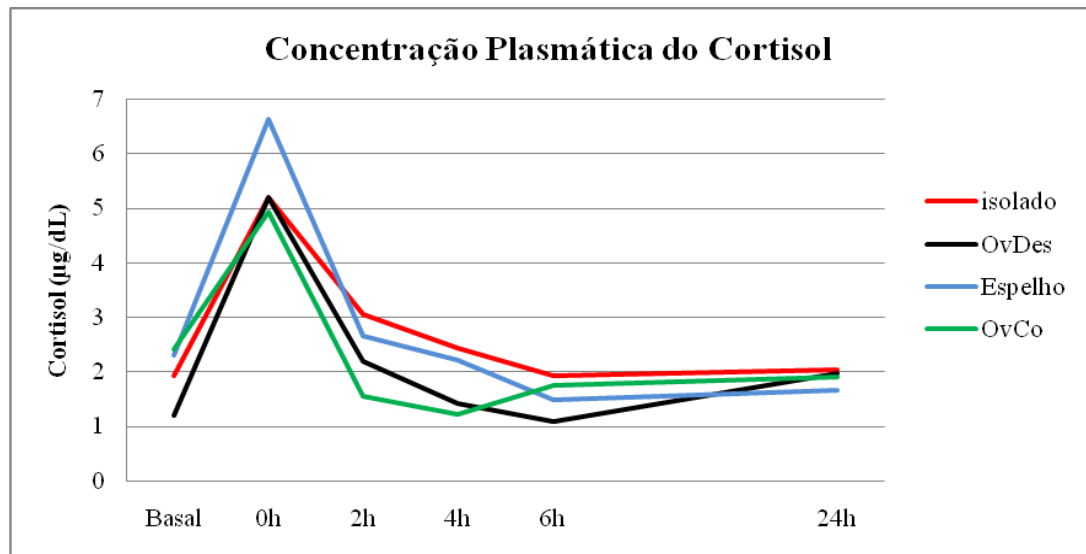


Figura 4 – Curva da concentração plasmática de cortisol dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), nos seis tempos avaliados.

Foi realizada a avaliação do declínio da concentração de cortisol nas duas primeiras horas após a chegada à UEA, através da porcentagem do tempo 2h em relação ao tempo 0h (considerado 100%). Dessa forma as diferenças entre os animais são amenizadas, reduzindo o desvio padrão (Tabela 2). Utilizando a ANOVA, não foi evidenciada significância estatística ($P=0,074$). No entanto, observa-se a tendência do grupo isolado apresentar a queda do cortisol de forma menos acentuada que o grupo OvCo, com os outros dois grupos com valores intermediários. Essa tendência foi significativa ($P<0,05$), testada pelo método de regressão através de ANOVA. Além disso, o Teste t para amostras independentes entre os grupos Isolado e OvCo é estatisticamente diferente ($P<0,05$) (Figura 5).

Tabela 2 – Média e desvio padrão da porcentagem da concentração plasmática de cortisol dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), no tempo 2h comparado ao pico de cortisol (0h).

Grupo	<i>n</i>	2h (%)
Isolado	6	54,08±18,53 ^a
Espelho	6	44,48±15,32
OvDes	6	43,52±8,81
OvCo	6	30,19±14,30 ^b

As médias seguidas de letras diferentes (*a, b*) diferem entre si pelo Teste *t* para amostras independentes (P<0,05).

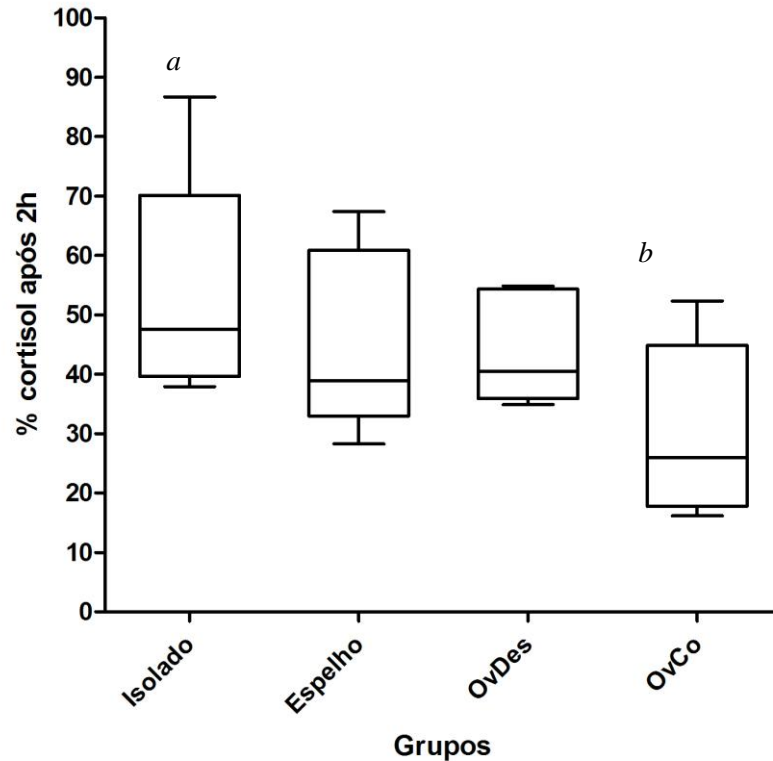


Figura 5 – Box Plot das porcentagens de concentração plasmática de cortisol do tempo 2h em relação ao tempo 0h dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido)
a, b diferem entre si pelo Teste *t* de amostras independentes ($P < 0,05$).

Outra análise realizada foi a comparação do cortisol basal com o cortisol no tempo 24h, também através de porcentagem, utilizando a ANOVA com *post hoc* Dunn. Observa-se diferença significativa entre os grupos Espelho e OvDes, conforme mostra a tabela 3.

Tabela 3 – Média e desvio padrão da porcentagem da concentração plasmática de cortisol dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido) no tempo 24h comparado ao cortisol basal

Grupo	<i>n</i>	24h (%)
Isolado	6	100,40±68,82
Espelho	6	47,89±31,03 ^a
OvDes	6	187,13±122,52 ^b
OvCo	6	87,94±50,54

As médias seguidas de letras diferentes (*a,b*) diferem entre si pelo Teste de Dunn ($P<0,05$).

5.2 Resultados da análise de comportamento

Os valores dos parâmetros comportamentais, avaliados a partir das filmagens realizadas nas primeiras seis horas de permanência na UEA, estão apresentados nas tabelas 4, 5, 6, 7 e 8. O tempo real de observação foi em média 5h 51min 42seg, com um desvio padrão de 7min 36seg, pois os tempos de intervenção para a coleta de sangue variaram entre os animais. Por isso, os dados de interação com o EA, do tempo gasto na alimentação e do tempo de descanso são apresentados em porcentagem. Os dados do tempo descansando e do número de balidos estão descritos de todos os animais, porque muitos valores foram iguais a zero.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos no número de passos, no tempo de interação com o EA, no tempo gasto comendo, no tempo gasto descansando e no número de balidos (Tabelas 4, 5, 7 e 8). Houve diferença estatística significativa no tempo de latência para começar a comer (Tabela 6), sendo o grupo Espelho e Ovdes diferentes do grupo OvCo ($P<0,05$).

Tabela 4 – Média e desvio padrão do número de passos dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), durante as seis horas de observação

Grupo	<i>n</i>	Nº de passos
Isolado	6	225,67±157,0
Espelho	6	181,83±57,71
OvDes	6	291,40±114,82
OvCo	6	200,67±68,64

Tabela 5 – Média e desvio padrão da porcentagem (%) de tempo interagindo com o enriquecimento ambiental (espelho, coespecífico ou nenhum enriquecimento) dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), durante as seis horas de observação

Grupo	<i>n</i>	% de tempo de interação com o E.A.
Isolado	6	27,40±12,19
Espelho	6	35,09±9,50
OvDes	6	24,02±15,34
OvCo	6	37,86±15,68

Tabela 6 – Média e desvio padrão da porcentagem (%) de tempo gasto na alimentação e da latência para iniciar a alimentação (min.) dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), durante as seis horas de observação

Grupo	<i>n</i>	% de tempo comendo	Latência para iniciar alimentação
Isolado	6	19,65±16,88	27,35±46,92
Espelho	6	18,14±11,64	4,00±3,43 ^a
OvDes	6	15,88±12,24	6,09±6,68 ^a
OvCo	6	8,46±10,95	114,94±117,50 ^b

As médias seguidas de letras diferentes (*a,b*) diferem entre si pelo Teste de Tukey ($P<0,05$).

Tabela 7 – Porcentagem (%) de tempo de descanso de todos os animais dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), durante as seis horas de observação.

Grupo	Isolado	Espelho	OvDes	OvCo
Animal	% tempo	% tempo	% tempo	% tempo
1	0	0	20,06	0
2	14,42	0	0	41,29
3	0	3,19	0	0
4	0	10,62	5,33	0
5	9,05	3,08	0	16,90
6	0,40	0	0	0

Também foi realizado um teste de correlação linear de Pearson, entre a concentração de cortisol no tempo 0h (pico) e o tempo que o animal passou deitado. Essa correlação é negativa e estatisticamente significativa ($P<0,05$; $r = - 0,449$), ou seja, quanto maior a concentração de cortisol após o transporte, menor o tempo de descanso do animal.

Tabela 8 – Número de balidos de todos os animais dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), durante as seis horas de observação

	Isolado	Espelho	OvDes	OvCo
Animal	Balidos	Balidos	Balidos	Balidos
1	14	0	5	38
2	6	0	4	0
3	7	0	0	0
4	0	0	17	42
5	1	0	0	0
6	137	10	0	0

Outros comportamentos observados foram: quatro tentativas de fuga durante a filmagem (duas no grupo OvCo, uma no grupo OvDes e uma no grupo Espelho) e duas fugas na coleta de sangue (grupo espelho).

5.3 Resultados da análise do consumo de alimento

Os valores médios \pm desvio padrão do consumo de ração e água são apresentados na tabela 9. Não foram constatadas diferenças estatísticas entre os grupos para nenhum dos dois parâmetros.

Tabela 9 – Média \pm desvio padrão do consumo de ração (g) e de água (ml) dos grupos Isolado (ovelha mantida sozinha), Espelho (ovelha mantida sozinha com EA de espelho), OvDes (ovelha mantida com coespecífico desconhecido) e OvCo (ovelha mantida com coespecífico conhecido), durante 24 horas de permanência no local do experimento

Grupo	Consumo de ração (g)	Consumo de água (ml)
Isolado	998,75 \pm 825,08	958,33 \pm 819,26
Espelho	1327,0 \pm 864,05	432,0 \pm 453,51
OvDes	1014,50 \pm 696,87	1115,0 \pm 625,93
OvCo	759,25 \pm 604,08	945,0 \pm 876,48

6 DISCUSSÃO

A utilização e a pesquisa das técnicas de enriquecimento ambiental para animais de laboratório no Brasil está aquém do observado em outros países, principalmente quando se trata de animais de fazenda ou de produção, como os ovinos. A utilização de espelhos para estimulação visual e simulação da presença de um coespecífico e/ou da percepção de que o ambiente é maior é uma alternativa simples e barata para animais gregários mantidos em isolamento (YOUNG, 2003; WELLS, 2009).

Parrot (1983) descreveu um modelo de agressão em ovinos machos expostos a painéis reflexivos. No entanto, mesmo mostrando a efetividade parcial dos espelhos como substitutos de outro animal em ovinos isolados, o estudo de Parrot, Houpt e Misson (1988) permanece como referência para a utilização desse tipo de EA. Nenhuma outra publicação foi encontrada nessa linha de pesquisa, de maneira que continua incerto se ovelhas vêem a imagem refletida no espelho como uma ameaça ou se o espelho pode, mesmo parcialmente, servir como EA.

O cálculo do tamanho amostral do nosso estudo foi baseado nos dados de cortisol apresentados por Parrot, Houpt e Misson (1988). Porém, observamos uma grande variabilidade de respostas nos animais, o que resultou num alto desvio padrão, não permitindo encontrar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos pela ANOVA.

6.1 Aspectos relacionados ao cortisol

A média basal da concentração plasmática do cortisol está de acordo com o encontrado na literatura ($2,24 \pm 0,36 \mu\text{g/dL}$), comprovando que o kit humano pode ser utilizado para a dosagem de amostras de ovinos.

A separação do rebanho e o transporte causaram um aumento estatisticamente significativo da concentração plasmática de cortisol. Essa é uma resposta típica ao isolamento social em ovinos e corrobora com diversos estudos que mediram cortisol logo após o isolamento de ovelhas (PRICE; THOS, 1980; NIEZGODA *et al.*, 1987; PARROTT;

HOUPT; MISSON, 1988; BALDOCK; SIBLY, 1990; COCKRAM *et al.*, 1994; BOUISSOU *et al.*, 1996; CARBAJAL; ORIHUELA, 2001; DA COSTA *et al.*, 2004; DOYLE *et al.*, 2010). O aumento transitório do cortisol indica que a ovelha está apresentando uma resposta homeostática normal (DWYER; LAWRENCE, 2008). Moberg (2000) sugere que o bem-estar do animal somente fica comprometido quando essas mudanças causam alterações no seu funcionamento biológico, levando a um estado pré-patológico.

Transcorridas duas horas de permanência no novo ambiente pode-se observar que a concentração plasmática do cortisol diminuiu de maneira semelhante nos quatro grupos, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre eles (ANOVA). No entanto, analisando a porcentagem que o tempo 2h representa em relação ao pico de cortisol (0h), verificou-se uma tendência do declínio do cortisol ser maior no grupo OvCo e menor no grupo Isolado, com os outros dois grupos em posições intermediárias e quase iguais. Essa tendência foi testada por regressão e foi estatisticamente significativa ($P < 0,01$ e $R = 0,512$).

Dessa forma, pode-se inferir que o tratamento espelho teve um efeito semelhante ao tratamento com a ovelha desconhecida, e que ambos foram melhores quando comparados ao grupo isolado sem EA. Esse resultado concorda com Parrot (1983), que sugere que as ovelhas consideram seu reflexo como um indivíduo estranho. No entanto, ao comparar a concentração de cortisol do tempo 24h com a medida basal, através de porcentagem, encontramos diferença significativa entre o grupo Espelho e o grupo OvDes. No grupo Espelho, todas as ovelhas apresentaram o cortisol do tempo 24h menor que o basal, enquanto que no grupo OvDes nenhuma ovelha retornou ao nível basal. Assim, verifica-se que ficar na companhia de uma ovelha desconhecida foi mais aversivo que a imagem do espelho.

Parrot, Houpt e Misson (1988) verificaram o efeito do espelho sobre o cortisol em ovelhas isoladas durante 105 minutos, com coletas de sangue a cada 15 minutos. Eles encontraram diferença significativa apenas a partir dos 75 minutos e concluíram que o espelho reduz a magnitude da resposta endócrina, sendo parcialmente efetivo na substituição de outro animal. Utilizando esse parâmetro para comparação (cortisol 24h), verifica-se que o grupo espelho foi o mais eficiente em retornar aos valores basais,

inclusive melhor que o grupo OvCo, o que corrobora com a conclusão do estudo citado anteriormente, sobre o espelho reduzir a magnitude da resposta endócrina.

Ainda utilizando-se a porcentagem do tempo 2h como parâmetro, verifica-se que os valores dos grupos Isolado e OvCo são diferentes no Teste *t* para amostras independentes ($P < 0,05$). Isso demonstra que a companhia de uma ovelha conhecida é importante na redução do estresse causado pela separação do rebanho. Carbajal e Orihuela (2001) concluem, com base no seu estudo, que a companhia de um coespecífico é suficiente para neutralizar o efeito estressante do isolamento social. No presente estudo, observa-se que o benefício é maior se o coespecífico é do mesmo rebanho. Segundo Nowak *et al* (2008), embora o contato social seja extremamente importante para as ovelhas, a presença de outra ovelha também pode atuar como uma fonte de estresse.

Observa-se que a curva do cortisol foi semelhante em todos os grupos, sem diferenças estatisticamente significativas. Uma característica importante de qualquer sistema homeostático é o feedback dos hormônios que regulam a sua própria produção, assim, a resposta normal de cortisol é constituída por um aumento na sua produção, seguido por um declínio (Dwyer; Lawrence, 2008). Essa diminuição da liberação de cortisol tem sido interpretada como uma redução na percepção da ameaça ou como habituação, considerando-se o animal menos estressado e com melhor bem-estar (Smith; Dobson, 2002). Por isso, a aclimatação do animal após o transporte e a exposição a um novo ambiente é fundamental antes de iniciar algum experimento, evitando ou minimizando a influência do estresse nos resultados (National Research Council, 1996; 2006). Geralmente, mediadores primários do estresse, como catecolaminas e glicocorticóides, retornam ao normal em 24 horas após o transporte, enquanto repostas secundárias (sistema imune, por exemplo) podem demorar mais tempo (Obernier; Baldwin, 2006).

Dois estudos demonstraram resultados semelhantes aos encontrados no presente experimento. Niezgodá (1987) e Cockram *et al* (1994) separaram ovelhas do rebanho e as isolaram durante cinco e 24 horas, respectivamente. Ambos observaram a ocorrência do pico de cortisol na medida de uma hora (equivalente ao nosso tempo zero) e diferenças significativas entre os grupos nas medidas de uma e três horas. Além disso, nos dois

estudos observou-se o declínio do cortisol após o pico, retornando aos níveis basais após nove e seis horas, respectivamente.

Nesses dois estudos citados anteriormente, as ovelhas foram isoladas repetidas vezes e os resultados encontrados foram diferentes. Niezgodá (1987) conclui que não ocorre adaptação ao estresse gerado em isolamentos repetidos, pois a cada isolamento foi observado um pico de cortisol. Por outro lado, Cockram *et al* (1994) conclui que ocorreu habituação ao isolamento, pois as ovelhas podem ter aprendido que sempre eram liberadas desse isolamento e conseguiram prever a frequência e duração do estressor. Isso demonstra que as respostas de um animal ao estresse são variáveis, tanto devido ao indivíduo (alguns indivíduos são mais capazes de lidar com o estresse do que outros), quanto às diferenças intra-espécies (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2008). São ainda afetadas pela raça, idade, experiência, estado fisiológico e sexo, e assim, ajustar um ponto de corte no valor de cortisol, acima do qual um estado pré-patológico pode estar presente, é impossível (DWYER; LAWRENCE, 2008).

Com relação à coleta de sangue, Cook *et al* (2000) sugere que a restrição do animal por si só pode causar estresse e confundir os resultados. Cockram *et al* (1994) canularam a jugular e fixaram um tubo extensor nas costas da ovelha, permitindo que a coleta do sangue fosse realizada sem contenção. Como a resposta do cortisol no presente estudo foi muito semelhante ao encontrado por Cockram *et al* (1994), inferimos que a rápida contenção aplicada para a coleta de sangue não influenciou nos resultados da concentração de cortisol.

6.2 Aspectos relacionados ao comportamento

Não foram encontradas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados, com exceção da latência para iniciar a alimentação. Segundo Bouissou *et al* (1996), a latência para iniciar a alimentação está correlacionada positivamente com medo, conforme escala validada por ela. No entanto, o grupo que apresentou a maior latência foi o grupo que estava na situação considerada melhor, ou seja, o grupo acompanhado da ovelha conhecida. Uma possível explicação é a dominância que

essa ovelha exerceu sobre as ovelhas experimentais, pois era uma ovelha maior, mais velha e de uma raça diferente. Também foi definida pelo proprietário como “aquela que as outras seguem”, o que confirma o status dela de líder. A liderança é um componente importante do comportamento social dos ovinos e é expressa por animais que iniciam os movimentos do grupo (NOWAK *et al.*, 2008).

Parrot, Houpt e Misson (1988) encontraram diferença estatisticamente significativa no grupo com espelho nos parâmetros “% de tempo no quadrante do espelho” e “% de tempo olhando na direção do espelho”, concluindo que o painel de espelho atraiu a atenção das ovelhas. No presente estudo, o “tempo de interação com o EA” não foi estatisticamente significativo, porém pode-se observar que a média da % de tempo de interação do grupo Espelho (35,09%) foi mais próxima à média do grupo OvCo (37,86%). O espelho atraiu mais a atenção das ovelhas que a ovelha desconhecida (24,02%).

Para Cockram *et al* (1994), os efeitos psicológicos do isolamento são observados nas ovelhas através do maior número de vocalizações e do comportamento de bater um membro no chão, além do menor tempo de descanso, de sono, de alimentação e ruminação. Carbajal e Orihuela (2001) também observaram maior número de passos e de vocalizações nas ovelhas isoladas. As ovelhas mostram inicialmente um aumento na atividade motora e nas vocalizações quando são socialmente isoladas (NOWAK *et al.*, 2008). Apesar de não haver diferença significativa nos parâmetros de atividade (número de passos e no tempo de descanso), observa-se uma correlação negativa entre a concentração de cortisol no momento 0h e o tempo de descanso. Esse dado contribui para validar a importância da aclimatação, mostrando como animais mais estressados descansam menos após o transporte e a exposição a um novo ambiente.

A mesma variabilidade entre os animais descrita para as medidas fisiológicas vale para o comportamento, pois os desafios de lidar com os estressores são encarados de forma diferente por cada ovelha (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2008). Devido à grande variabilidade observada nos dados dos animais do presente estudo e com o tamanho amostral de seis ovelhas por grupo, não foi possível detectar diferenças estatísticas nos parâmetros que literatura relata. Além disso, a falta de grupo controle (sem intervenção)

dificulta a identificação de comportamentos associados ao estresse, como os descritos por Cockram *et al* (1994).

6.3 Aspectos relacionados ao consumo de alimento

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas no consumo de ração e água. A troca de ambiente para ovelhas pode causar estresse, que pode ser expresso por apatia e diminuição na ingestão (DWYER; LAWRENCE, 2008). Segundo Nowak *et al* (2008), pode haver redução no consumo de alimento e água se o isolamento é prolongado. Nenhum dos estudos citados anteriormente relata a quantificação de alimento e água, por tanto a discussão fica prejudicada.

Considerando que as ovelhas da raça Corriedale entre um e dois anos têm entre 30 e 40 quilos, espera-se uma ingestão média entre 900 e 1200 gramas (3% do peso vivo). Assim, verifica-se que a média de consumo de ração ficou dentro desse limite, exceto para o grupo OvCo, que também teve o maior tempo de latência para iniciar a alimentação. Da mesma forma que a ovelha conhecida afetou a latência, através de seu status de líder, pode ter afetado o consumo da ração.

Outro dado interessante de ser destacado é sobre o baixo consumo de feno, o qual as ovelhas não estavam habituadas a ingerir. A ovelha não altera seu hábito alimentar em 24 horas e isso deve ser observado, por exemplo, ao transferir um ovino do campo para uma instituição de pesquisa, procurando saber qual alimento esse animal está acostumado. Por isso, solicitamos que o produtor rural trouxesse a ração das ovelhas do presente estudo.

7 CONCLUSÕES

Conforme a metodologia empregada e nas condições em que o trabalho foi conduzido, podemos concluir que:

- Embora sem diferença estatística, observa-se uma tendência nas primeiras duas horas do declínio do cortisol ser mais acentuado no grupo OvCo quando comparado ao grupo isolado. Nesse período, os grupos Espelho e OvDes tiveram declínio da concentração de cortisol semelhantes.
- No entanto, o grupo Espelho foi eficaz no retorno da concentração do cortisol aos níveis basais no tempo 24h, sendo estatisticamente diferente do grupo OvDes.
- Considerando apenas o parâmetro cortisol, podemos concluir que o EA com espelho foi semelhante (tempo 2h) ou melhor (tempo 24h) que o grupo OvDes, identificando que o espelho pode substituir uma companhia de um coespecífico.
- A análise comportamental não evidenciou diferença estatística entre os grupos com e sem enriquecimento nos parâmetros avaliados. Dessa forma, não se pode afirmar que o espelho provoca respostas comportamentais semelhantes a um coespecífico, mas verifica-se que ele não causa nenhuma resposta de estresse significativa.
- A separação do rebanho e o transporte causaram um aumento significativo da concentração de cortisol, corroborando com a literatura, que relata esses dois procedimentos como estressores.
- Ressaltamos a importância da realização de aclimação para animais submetidos a transporte e alojamento em um novo ambiente. Baseando-nos na concentração de cortisol, podemos afirmar que após 24 horas as ovelhas retornaram aos valores basais, com exceção do grupo OvDes.

8 PERSPECTIVAS

O presente trabalho nos mostra diretrizes para estudos futuros, em que se poderiam avaliar outros parâmetros comportamentais, como por exemplo posição das orelhas e dos olhos (COCKRAM *et al.*, 1994). Além disso, os parâmetros comportamentais podem ser analisados hora a hora, para identificar possíveis diferenças ligadas ao tempo no novo ambiente. Também temos como perspectivas aumentar o tamanho amostral desse estudo, buscando minimizar a variabilidade observada nos dados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPLEBY, M. C. Enrichment for farm animals. In: UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (Ed.). Environmental Enrichment Information Resources for Laboratory Animals. Washington: USDA, 1995. p.69-112.

BALDOCK, N. M.; SIBLY, R. M. Effects of handling and transportation on the heart rate and behaviour of sheep. Applied Animal Behaviour Science, v.28, n.1-2, p.15-39. 1990.

BARRY, J. S.; ANTHONY, R. V. The pregnant sheep as a model for human pregnancy. Theriogenology, v.69, n.1, Jan 1, p.55-67. 2008.

BLOOMSMITH, M. A.; BRENT, L. Y.; SCHAPIRO, S. J. Guidelines for developing and managing an environmental enrichment program for nonhuman primates. Laboratory Animal Science, v.41, n.4, Aug, p.372-377. 1991.

BOUISSOU, M. F. *et al.* Influence of a conspecific image of own vs. different breed on fear reactions of ewes. Behavioural Processes, v.38, n.1, p.37-44. 1996.

BROOM, D. M. *et al.* Hormonal and physiological effects of a 15 hour road journey in sheep: comparison with the responses to loading, handling and penning in the absence of transport. British Veterinary Journal, v.152, n.5, Sep, p.593-604. 1996.

CABOS, N. S. Biología general del reactivo biológico. In: ZUNIGA, J. M., *et al* (Ed.). Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, v.1, 2001. p.23-82.

CARBAJAL, S.; ORIHUELA, A. Minimal Number of Conspecifics Needed to Minimize the Stress Response of Isolated Mature Ewes. Journal of Applied Animal Welfare Science, v.4, n.4, p.249 - 255. 2001.

CARTER, A. M. Animals Models in Fetal Physiology. In: SVENDSEN, P.;HAU, J. (Ed.). Handbook of Laboratory Animal Science. Flórida: CRC Press, v.2, 1994. p.77-92.

_____. Animal models of human placentation--a review. Placenta, v.28 Suppl A, Apr, p.541-47. 2007.

COCKRAM, M. S. *et al.* The behavioural, endocrine and immune responses of sheep to isolation. Animal Production, v.58, p.389-399. 1994.

COLEMAN, K. Psychological Enrichment for Animals in Captivity. In: CONN, P. M. (Ed.). Sourcebook of Models for Biomedical Research. Totowa: Humana Press, v.1, 2008. p.55-63.

COOK, C. J. *et al.* Hands-on and Hands-off Measurement of Stress. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. (Ed.). The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. Oxon: CABI Publishing, v.1, 2000. p.123-146.

DA COSTA, A. P. *et al.* Face pictures reduce behavioural, autonomic, endocrine and neural indices of stress and fear in sheep. Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences, v.271, Oct 7, p.2077-2084. 2004.

DALLE ZOTTE, A. *et al.* Rabbit preference for cages and pens with or without mirrors. Applied Animal Behaviour Science, v.116, n.2-4, p.273-278. 2009.

DOYLE, R. E. *et al.* Release from restraint generates a positive judgement bias in sheep. Applied Animal Behaviour Science, v.122, n.1, p.28-34. 2010.

DWYER, C. M.; LAWRENCE, A. B. Introduction to Animal Welfare and the Sheep. In: DWYER, C. (Ed.). The Welfare of Sheep. Edinburgh: Springer Netherlands, v.1, 2008. p.1-40.

FRASER, A. F. Sheep. In: ROLLIN, B. E. (Ed.). Experimental Animal in Biomedical Research. Colorado: CRC-Press, v.2, 1995. p.560.

HARGREAVES, A. L.; HUTSON, G. D. Handling systems for sheep. Livestock Production Science, v.49, n.2, p.121-138. 1997.

HENRY, L. *et al.* The use of a mirror as a []social substitute' in laboratory birds. Comptes Rendus Biologies, v.331, n.7, p.526-531. 2008.

HUGGETT, A. S.; WIDDAS, W. F. The relationship between mammalian foetal weight and conception age. Journal of Physiology, v.114, n.3, Jul, p.306-317. 1951.

JONES, S. E.; PHILLIPS, C. J. C. The effects of mirrors on the welfare of caged rabbits. Animal Welfare, v.14, p.195-202. 2005.

KAY, R.; HALL, C. The use of a mirror reduces isolation stress in horses being transported by trailer. Applied Animal Behaviour Science, v.116, n.2-4, p.237-243. 2009.

KENDRICK, K. M. Sheep Senses, Social Cognition and Capacity for Consciousness. In: DWYER, C. (Ed.). The Welfare of Sheep. Edinburgh: Springer Netherlands, v.1, 2008. p.135-157.

KENDRICK, K. M. *et al.* Facial and vocal discrimination in sheep. Animal Behaviour, v.49, n.6, p.1665-1676. 1995.

MATTERI, R. L.; CARROLL, J. A.; DYER, C. J. Neuroendocrine Responses to Stress. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. (Ed.). The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. Oxon: CABI Publishing, v.1, 2000. p.43-76.

MCAFEE, L. M.; MILLS, D. S.; COOPER, J. J. The use of mirrors for the control of stereotypic weaving behaviour in the stabled horse. Applied Animal Behaviour Science, v.78, n.2-4, p.159-173. 2002.

MEEUSEN, E. N. *et al.* Sheep as a model species for the study and treatment of human asthma and other respiratory diseases. Drug Discovery Today: Disease Models, v.In Press, Corrected Proof. 2010.

MEIJ, B. P.; MOL, J. A. Adrenocortical function. In: KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. (Ed.). Clinical biochemistry of domestic animals. San Diego, Calif.: Academic Press, v.1, 2008. p.605-622.

MILLS, D. S.; DAVENPORT, K. The effect of a neighbouring conspecific *versus* the use of a mirror for the control of stereotypic weaving behaviour in the stabled horse. Animal Science, v.74, p.95-101. 2002.

MOBERG, G. P. Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare. In: MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. (Ed.). The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. Oxon: CABI Publishing, v.1, 2000. p.1-21.

MOSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. Domestic Animal Endocrinology, v.23, n.1-2, Jul, p.67-74. 2002.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, D.C.: National Academy Press. 1996. 162 p.

_____. Guidelines for the humane transportation of research animals. Washington, D.C.: National Academies Press. 2006. 141 p.

_____. Recognition and alleviation of distress in laboratory animals. Washington, D.C.: National Academies Press: 132 p. 2008.

NIEZGODA, J. *et al.* Lack of adaptation to repeated emotional stress evoked by isolation of sheep from the flock. Zentralbl Veterinarmed A, v.34, n.10, Dec, p.734-739. 1987.

NOWAK, R. *et al.* Behaviour and the Welfare of the Sheep. In: DWYER, C. (Ed.). The Welfare of Sheep. Edinburgh: Springer Netherlands, v.1, 2008. p.81-134.

NUNAMAKER, D. M. Experimental models of fracture repair. Clinical Orthopaedics and Related Research, n.355 Suppl, Oct, p.S56-65. 1998.

- NUSS, K. M. *et al.* An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. BMC Musculoskeletal Disord, v.7, p.67. 2006.
- OBERNIER, J. A.; BALDWIN, R. L. Establishing an appropriate period of acclimatization following transportation of laboratory animals. ILAR Journal, v.47, n.4, p.364-369. 2006.
- OLSSON, I. A. S. *et al.* Understanding behaviour: the relevance of ethological approaches in laboratory animal science. Applied Animal Behaviour Science, v.81, n.3, p.245-264. 2003.
- PALESTRINI, C. *et al.* Relationship between behaviour and heart rate as an indicator of stress in domestic sheep under different housing systems. Small Ruminant Research, v.27, p.177-181. 1998.
- PARROTT, R. F. A method for the quantification of butting activity in androgen-treated wethers. Applied Animal Ethology, v.10, n.4, p.319-324. 1983.
- PARROTT, R. F.; HOUP, K. A.; MISSON, B. H. Modification of the responses of sheep to isolation stress by the use of mirror panels. Applied Animal Behaviour Science, v.19, n.3-4, p.331-338. 1988.
- PEARCE, A. I. *et al.* Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. European Cells and Materials, v.13, p.1-10. 2007.
- PEKOW, C. Defining, Measuring, and Interpreting Stress in Laboratory Animals. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, v.44, p.41-45. 2005.
- PILLER, C. A. K.; STOOKEY, J. M.; WATTS, J. M. Effects of mirror-image exposure on heart rate and movement of isolated heifers. Applied Animal Behaviour Science, v.63, n.2, p.93-102. 1999.
- POOLE, T. Happy animals make good science. Laboratory Animals, v.31, n.2, April 1, 1997, p.116-124. 1997.
- PRICE, E. O.; THOS, J. Behavioral responses to short-term social isolation in sheep and goats. Applied Animal Ethology, v.6, n.4, p.331-339. 1980.
- REINHARDT, V. Common husbandry-related variables in biomedical research with animals. Laboratory Animals, v.38, n.3, Jul, p.213-235. 2004.
- SCHEERLINCK, J.-P. Y. *et al.* Biomedical applications of sheep models: from asthma to vaccines. Trends in Biotechnology, v.26, n.5, p.259-266. 2008.
- SHERWIN, C. M. Mirrors as potential environmental enrichment for individually housed laboratory mice. Applied Animal Behaviour Science, v.87, n.1-2, p.95-103. 2004.

SMITH, R. F.; DOBSON, H. Hormonal interactions within the hypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. Domestic Animal Endocrinology, v.23, n.1-2, p.75-85. 2002.

TAROU, L. R.; BASHAW, M. J. Maximizing the effectiveness of environmental enrichment: Suggestions from the experimental analysis of behavior. Applied Animal Behaviour Science, v.102, n.3-4, p.189-204. 2007.

TATE, A. J. *et al.* Behavioural and neurophysiological evidence for face identity and face emotion processing in animals. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, v.361, n.1476, Dec 29, p.2155-2172. 2006.

TURNER, A. S. Experiences with sheep as an animal model for shoulder surgery: strengths and shortcomings. Journal of Shoulder and Elbow Surgery, v.16, n.5 Suppl, Sep-Oct, p.S158-163. 2007.

VAN-ADRICHEM, P. W. M.; VOGT, J. E. The effect of isolation and separation on the metabolism of sheep. Livestock Production Science, v.33, p.151-159. 1993.

WEED, J. L.; RABER, J. M. Balancing animal research with animal well-being: establishment of goals and harmonization of approaches. ILAR Journal, v.46, n.2, p.118-128. 2005.

WELLS, D. L. Sensory stimulation as environmental enrichment for captive animals: A review. Applied Animal Behaviour Science, v.118, n.1-2, p.1-11. 2009.

YOUNG, R. Environmental Enrichment for Captive Animals. Oxford: Wiley-Blackwell, v.1. 2003. 240 p.