Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

# Avaliação do temperamento de ovelhas das raças Ile-de-France e Churra da Terra Quente

Respostas do comportamento e do nível de cortisol num teste de arena

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica

**Mariana Dantas de Brito Almeida**

Orientador: Severiano José Cruz da Rocha e Silva

Vila Real, Setembro 2014

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

# Avaliação do temperamento de ovelhas das raças Ile-de-France e Churra da Terra Quente

Respostas do comportamento e do nível de cortisol num teste de arena

Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica

**Mariana Dantas de Brito Almeida**

Orientador: Severiano José Cruz da Rocha e Silva

Composição do Júri:

_____

_____

_____

Vila Real, Setembro 2014

As doutrinas apresentadas são da exclusiva

responsabilidade da autora.

## Agradecimentos

Aos meus pais, que me apoiaram, incondicionalmente, nesta jornada, nunca duvidando de que conseguiria chegar tão longe quanto quisesse. Sem eles nada disto seria possível.

Ao Professor Doutor Severiano Silva, orientador desta dissertação, pela sugestão do tema, cedência de bibliografia, sempre pronto a tirar todas as dúvidas e a sossegar-me nos momentos de maior elevação do cortisol.

Ao Engenheiro Paulo Fontes, aos tratadores das instalações da UTAD, à D. Carla, sem eles teria sido impossível realizar a parte prática deste trabalho. Um agradecimento especial ao Engenheiro Paulo pelas horas que dispensou a este projeto.

À Professora Doutora Rita Payan e ao Professor Celso Santos, que se disponibilizaram para me ajudar a analisar as amostras de plasma, facultando-me uma preciosa ajuda.

Aos meus amigos, todos à sua maneira me ajudaram, sem deixar de fazer alguns destaques:

À Sara, Fátima e Liliana, as três mosqueteiras que me acompanharam desde o início nesta viagem pela vida académica.

Às pequenas Adriana, Ana e Rita, que me ensinaram a não desistir de acreditar que o bem ainda reside em algumas pessoas.

Ao Pedro e à Rute, à Diana César e ao Daniel, amizades de longa data que perseveram com fortes raízes.

Aos caríssimos colegas da colheita de 2009/2010, que tão bem me acolheram (e a uns quantos mais) no seu seio.

E porque os últimos são os primeiros, à Diana Teixeira, que me incentivou dia após dia a trabalhar mais, sempre disponível para qualquer pedra no caminho.

À Professora Branca, à Professora Maria José Neves, à Professora Júlia Rodrigues e à Professora Iwona Saiote, que me mostraram verdadeiramente que o trabalho de um Professor não termina quando termina a aula.

A todos vós, o meu sincero obrigada!

## Abstract

The knowledge of temperament in farm animal species contributes for a better management and for better animal selection. Temperament can influence reproduction traits – maternal behavior, pregnancy development – but also productive traits – average gain, milk production, meat production and respective quality. There are many temperament tests, but the arena test with a static operator, is one of the most reliable for sheep. In this study it was hypothesized that there are differences in temperament between Churra da Terra Quente (CTQ) and Ile-de-France (IF) sheep, the last being more nervous, and that the animals undergo some habituation to the test.

Ten adult sheep, 5 CTQ and 5 IF, were used in this study. 4 animals of each breed were submitted to test and 3 of these undergo blood sampling. The arena test mentioned above was performed. The operator was static for 10 minutes, in closed indoors, and the animal behavior was filmed. The statistical analyses revealed significant differences ($P < 0.05$) in locomotor activity, the IF being more active (2.86 m $min^{-1}$ *vs* 2.31m $min^{-1}$). IF sheep also show an increased activity through an higher number of loud bleats and a lower latency in bleating for the first time (48 *vs* 18 and 0.642 *vs* 4.9; $P < 0.05$, respectively for IF and CTQ). The cortisol analyses are consistent with the other studies, the IF sheep having higher values (2.603 µg $dL^{-1}$ *vs* 2.096 µg $dL^{-1}$; $P < 0.05$). There were no significant differences between the two breed previous to the test but after the test the IF sheep had higher cortisol values (4.128 µg $dL^{-1}$ *vs* 3.239 µg $dL^{-1}$), meaning that the test allows to establish differences between breeds.

These results demonstrate that the arena test with a static operator can be a simple procedure, capable for evaluating sheep temperament.

**Palavras-chave:** Churra da Terra Quente, Ile-de-France, temperament, locomotion, behavior, cortisol.

## Resumo

O conhecimento do temperamento dos animais de produção contribui para melhorar o maneio mas também para a seleção dos mesmos. O temperamento pode ter influência em fatores reprodutivos – conduta maternal, desenvolvimento do feto – mas também em fatores produtivos – ganho médio diário, produção de leite, produção de carne. Existem vários testes de temperamento, sendo o teste da arena com operador estático um dos mais utilizados em ovinos. Com este estudo pretende-se comprovar a existência de diferenças de temperamento entre ovinos das raças Churra da Terra Quente (CTQ) e Ile-de-France (IF). É colocada a hipótese de que os IF são mais nervosos.

Neste estudo foram utilizados 10 ovinos, 5 da raça CTQ e 5 da raça IF. Foram realizados testes a 4 animais de cada raça e recolha de sangue a 3. O teste utilizado foi o acima mencionado. O operador permaneceu estático durante 10 minutos, numa arena, e foram gravados os comportamentos do animal. A análise estatística revelou diferenças significativas ($P < 0,05$) na atividade locomotora dos animais, sendo os IF mais ativos (2,86 $mmin^{-1}$ *vs* 2,31 $mmin^{-1}$). Os ovinos IF também demonstram uma maior atividade comportamental através de um maior número de vocalizações altas e uma menor reticência em vocalizar alto pela primeira vez (48 *vs* 18 e 0,642 *vs* 4,9; $P < 0,05$, respetivamente para IF e CTQ). A análise dos níveis de cortisol corroboram os resultados obtidos na análise dos comportamentos, tendo sido encontrados valores superiores nos ovinos IF (2,603 µg $dL^{-1}$ *vs* 2,096 µg $dL^{-1}$; $P < 0,05$). Não foram encontradas diferenças significativas nas recolhas anteriores ao teste mas na recolha posterior, os animais IF apresentam valores superiores (4,128 µg $dL^{-1}$ *vs* 3,239 µg $dL^{-1}$; $P < 0,05$), ou seja, o teste permite estabelecer diferenças entre as duas raças.

Estes resultados demonstram que o teste de arena com operador estático pode ser um procedimento simples que permite avaliar o temperamento de ovinos.

**Palavras-chave:** Churra da Terra Quente, Ile-de-France, temperamento, locomoção, comportamento, cortisol.

## Índice

Agradecimentos ..... VII
Abstract ..... IX
Resumo ..... XI
Índice de Figuras ..... XV
Índice de Quadros ..... XVII
Lista de Abreviaturas ..... XIX
1. Introdução ..... 1
2. Revisão Bibliográfica ..... 3
2.1. Avaliação do temperamento em animais ..... 3
2.2. O efeito do genótipo no temperamento ..... 5
2.3. O temperamento e a produção ..... 6
2.4. O cortisol como indicador fisiológico associado ao temperamento ..... 9
3. Trabalho experimental ..... 11
3.1. Material e métodos ..... 11
3.2. Maneio e Medições ..... 11
3.2.1. Método utilizado ..... 12
3.2.2. Análise do comportamento durante o teste ..... 13
3.2.3. Análise da atividade locomotora ..... 15
3.2.4. Análise do cortisol ..... 15
3.2.5. Análise estatística ..... 18
3.3. Resultados e discussão ..... 19
3.3.1. Distância percorrida (atividade de locomoção) ..... 19
3.3.2. Indicadores de comportamento ..... 21
3.3.3. Indicador fisiológico cortisol ..... 23
4. Considerações finais ..... 26
5. Bibliografia ..... 27
Anexo A ..... 33

## Índice de Figuras

**Figura 1 –** Efeitos da seleção tendo em conta o temperamento (adaptado de Blache *et al.*, 2010) ..... 8
**Figura 2 –** Arena de teste. Elaboração própria. .....12
**Figura 3 –** Exemplo de imagens analisadas dos testes efetuados com CTQ (à esquerda) e IF (à direita). Elaboração própria. .....13
**Figura 4 –** Exemplo do desenho da arena de teste com o percurso traçado e com o *layout* da análise de imagem no programa ImageJ. Elaboração própria. .....15
**Figura 5 –** Amostras de plasma congelado. Elaboração própria. .....16
**Figura 6 –** Sistema Immulite®. Elaboração própria. .....16
**Figura 7 –** Amostras prontas para serem analisadas pelo sistema Immulite®. Elaboração própria. .....17
**Figura 8 –** Monitorização da leitura das amostras do sistema Immulite®. Elaboração própria. .....17
**Figura 9 –** Atividade (m min.-1) das ovelhas IF e CTQ ao longo do tempo. Barras encimadas com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05). Elaboração própria. .....20
**Figura 10 –** Nível de cortisol plasmático (µg dL-1) para as ovelhas CTQ e IF e para o momento da recolha. Barras encimadas com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05). Elaboração própria. .....25

## Índice de Quadros

**Quadro 1 –** Etograma de comportamentos. .....14
**Quadro 2 –** Distância percorrida pelos animais durante o período de teste (m min.$^{-1}$). .....19
**Quadro 3 –** Frequência ou duração dos comportamentos dos animais durante o teste. .....21
**Quadro 4 –** Nível de cortisol plasmático (µg dL$^{-1}$) para as ovelhas CTQ e IF e para o momento da recolha. .....23

## Lista de Abreviaturas

**CTQ** – Churra da Terra Quente

**IF** – Ile-de-France

**HHA** – Hipotálamo-hipófise-adrenal

**R** – Raça

**S1** – Semana 1

**S2** – Semana 2

**S3** – Semana 3

**m** – Metros

**min** – Minutos

**T** – Tempo

**P** – Probabilidade

**Voc.** – Vocalizações

**MR** – Momento da Recolha

**AT** – Antes do teste

**DT** – Depois do teste

## 1. Introdução

Nos sistemas de produção animal, os animais são confrontados com algumas práticas de maneio que implicam aumento do stresse. São exemplo disso a organização de grupos, movimento de animais, práticas de contenção, identificação e outras que, de forma corrente, se fazem nas explorações. Dependendo do sistema de produção utilizado (extensivo ou intensivo), os animais podem ser expostos a várias destas práticas ao longo do ano e que no caso dos ovinos, por ser uma espécie muito reativa a situações adversas (Forkman *et al.*, 2007), condições de isolamento, de sobrelotação (Ligout *et al*., 2011) ou de interrupção da organização social do rebanho (Nowak *et al.*, 2008) geram situações de stresse nos animais que tornam as tarefas de maneio mais exigentes em tempo e na interação com os animais. As respostas dos animais a essas práticas de maneio dependem em larga parte do temperamento dos mesmos.

O temperamento é definido como a reatividade dos animais na resposta a uma situação nova ou potencialmente ameaçadora e pode ser medido expondo os animais a ambientes com os quais não se encontram familiarizados (Nowak *et al.*, 2006). O termo é também utilizado para indicar a facilidade ou dificuldade com que o animal é conduzido, pesado ou tratado, assim como, para descrever a sua capacidade maternal ou o seu comportamento quando submetido ao maneio de rotina (Morris *et al.*, 1994). Segundo Réale *et al.* (2000) as diferenças individuais de temperamento podem afetar o modo como os animais reagem a novas situações, evitam a predação e se comportam num contexto social. Sendo assim, a seleção dos animais tendo em consideração o seu temperamento pode trazer benefícios aos animais mas também ao produtor, pois animais que demonstram ser mais calmos durante um maneio de rotina apresentam também uma menor probabilidade de se magoarem ou de magoarem os seus tratadores (Ferguson *et al.*, 2008) e permitem otimizar as práticas de maneio e aumentar o bem-estar dos animais (Fraser *et al.*, 2013).

Para avaliar o temperamento são realizados testes que permitem identificar diferenças entre os animais e que permitem aos produtores a escolha de reprodutores de acordo com o seu temperamento, o que irá facilitar as práticas de maneio (Dodd *et al.* 2012). Foi assim ao longo da história da domesticação com a escolha de animais mais dóceis (Villalba *et al.*, 2009) e é assim na atualidade com o aparecimento de projetos e trabalhos recentes que se centram no temperamento dos animais e na interação homem-animal (Waiblinger *et al.*, 2006; Fraser *et al*., 2013). Assim, ao longo do tempo têm sido realizados testes, em diferentes espécies, que permitem avaliar o temperamento e como este pode afetar a

produção e/ou o bem-estar dos animais. São exemplos os trabalhos realizados em ovinos (Beausoleil *et al.*, 2008; Blache *et al.*, 2010; Henry *et al.*, 2010; Pajor *et al.*, 2010; Silveira *et al.*, 2010; Ligout *et al.*, 2011; Beausoleil *et al.*, 2012; Caroprese *et al.*, 2012; Cloete *et al.*, 2014); em bovinos (Breuer *et al.*, 2000; Burdick *et al.*, 2010; Cafe *et al.*, 2011); em búfalos (Scárdua *et al.*, 2009; Gonzaga *et al.*, 2010), em aves (Keer-Keer *et al.*, 1996), em suínos (Hansson *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2008), em equinos (Seaman *et al.*, 2002); Lansade *et al.*, 2008a; Lansade *et al.*, 2008b) em ratos (Kulesskaya *et al.*, 2014), em peixes (Nakayama *et al.*, 2012) e em primatas (Herrmann *et al.*, 2011).

É neste quadro que foi realizado este trabalho e que tem por objetivo compreender as diferenças de temperamento entre duas raças de ovinos, Churra da Terra Quente e Ile-de-France avaliadas num teste de arena com exposição a um operador humano estático. Foram colocadas como hipóteses: *i* - a existência de diferenças de temperamento entre os ovinos da raça Churra da Terra Quente e raça Ile-de-France; *ii* - ao longo do tempo os animais terão reações cada vez menores ao teste efetuado. Pretende-se, ainda, que este trabalho constitua um contributo para o conhecimento científico sobre este tipo de teste e para o alargamento do conhecimento sobre do temperamento das duas raças estudadas.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Avaliação do temperamento em animais

A avaliação do temperamento dos animais de produção é realizada através de testes de comportamento, impondo aos animais situações de restrição com as quais não se encontram familiarizados (Ligout *et al.*, 2011). Um dos testes utilizados para avaliar o temperamento em animais de produção, é o teste da arena, que consiste em colocar o animal numa situação de isolamento, contabilizando aspetos do seu comportamento de resposta à situação da arena, podendo a avaliação ter uma componente objetiva e/ou subjetiva. Murphy *et al.* (1994) testaram os animais numa arena, na qual estes teriam de entrar na zona onde se encontrava um operador humano estático para poderem estar mais perto dos seus congéneres. O mesmo teste, com pequenas alterações, tem sido utilizado para medir o temperamento em ovinos, assim como para avaliar a capacidade maternal das ovelhas (Kilgour, 1998; Goddard *et al.*, 2000; Beausoleil *et al.,* 2008; Deiss *et al.*, 2009; Beausoleil *et al.*, 2012; Caroprese *et al.*, 2012).

Também o número de animais na arena de teste apresenta variações. Por exemplo Kilgour *et al.*, (1997) estudaram num teste de arena ovinos individualmente e em grupos de quatro. Com este trabalho foi concluído que nos testes individuais, animais selecionados para a capacidade maternal percorriam maiores distâncias e produziam um maior número de vocalizações em relação aos não selecionados. As vocalizações são consideradas um sinal de nervosismo por parte dos animais (Nowak *et al.*, 2008) daí serem utilizadas para medir o seu temperamento. Kilgour *et al.*, (1997) ainda observaram que os animais apresentaram maior tendência a urinar e defecar no teste individual. Os autores interrogaram-se se estas diferenças não poderiam significar que o teste individual na arena estaria a medir a reação dos animais ao stresse agudo provocado pelo facto de se tratar de um teste individual. No entanto, visto que não obtiveram diferenças nas medições do nível de cortisol entre os dois grupos, concluíram que o teste de arena não mede a reação destes animais ao stresse agudo a que estão sujeitos, indicando sim o seu temperamento.

Para além de avaliar o comportamento dos animais face a um operador humano estático, também são realizados testes nos quais o operador se aproxima do animal, para que possa ser avaliada a sua distância de fuga (Gómez, 2007; Gutiérrez-Gil *et al.*, 2008; Deiss *et al.*, 2009). Pajor *et al.* (2008) avaliaram o comportamento de ovinos em jaulas de contenção atribuindo um score de 1 a 5 ao seu temperamento e avaliando de seguida o

tempo que demorava ao mesmo animal percorrer determinada distância quando largado numa arena. O estudo do temperamento também pode ser útil para determinar o comportamento gregário e o comportamento de pastoreio dos animais. Neste sentido, Michelena *et al.* (2009) constataram que ovinos com um comportamento mais nervoso, demonstram uma maior propensão para se afastarem dos outros elementos do grupo, evidenciando um maior comportamento exploratório mas aumentando a probabilidade de formação de subgrupos. Os autores concluíram ainda que este tipo de comportamento pode levar a uma influência negativa nos hábitos de alimentação do grupo.

A presença humana parece alterar o comportamento dos ovinos o que permite evidenciar o seu temperamento (Goméz, 2007) e mostrar a variação de respostas de cada indivíduo, o que permite ter informação sobre o temperamento individual (Beausoleil *et al.*, 2008). Estes aspetos permitem apontar que será apropriado conduzir testes individuais com a presença de um operador humano para a avaliação do temperamento em ovinos. Réale *et al.* (2000) estudaram o temperamento de ovinos através de uma avaliação sem a presença de um humano, que consistia na observação da reação dos animais perante a escolha de entrarem num cercado no qual se encontrava uma recompensa. Os autores concluíram que o temperamento dos animais estudados não dependia da sua idade ou estado reprodutivo, assim como da sua massa corporal. No mesmo estudo também foi demonstrado que não havia relação entre a docilidade de um animal com a sua posição hierárquica no grupo, provavelmente por esta não estar relacionada com a agressividade.

Seria interessante criar modos de avaliar o temperamento animal sem a presença de operadores, tentando determinar se há uma relação entre o seu comportamento habitual e o comportamento nos testes de temperamento (Sebastian *et al.*, 2011). Tendo em conta a diversidade de testes passíveis de serem utilizados em ovinos, será fundamental criar um sistema de avalização de temperamento padrão, que permita estabelecer comparações mais fiéis entre raças e sistemas de produção (Dodd *et al.*, 2012).

## 2.2. O efeito do genótipo no temperamento

Existe uma grande variabilidade na reatividade dos animais, sendo que esta se traduz num traço fenotípico denominado temperamento (Blache *et al.*, 2010) que é determinado pela interação entre fatores genéticos e ambientais (Grandin, 1998). A este propósito Silveira (2005) afirma que, se a genética do animal influencia a sua reação de medo, então o temperamento pode ser parcialmente determinado pela resposta do indivíduo ao medo. Este aspeto foi certamente o que levou Le Neindre *et al.* (1993) a conduzirem trabalho de comportamento em ovinos de diferentes raças. Estes autores observaram diferenças de comportamento face à presença de um humano, por parte de duas raças diferentes e consequente cruzamento. Utilizando ovinos de raça Merino e Romanov, os autores concluíram que os primeiros se aproximavam mais facilmente do operador e produziam mais vocalizações. Ainda que possa ser afirmado que os animais de raça Merino possam vocalizar mais, não sendo necessariamente uma reação à presença do humano, os autores concluem que poderá ser positivo fazer uma seleção dos animais consoante a sua reação ao operador, ou seja, ao seu temperamento. Num estudo posterior (Wolf *et al.*, 2008) ficou demonstrado que existe variação hereditária do comportamento das ovelhas no teste da arena e que a seleção genética dos animais pode reduzir as reações de medo para com os humanos.

A este propósito Kilgour (1998) usou o teste da arena para medir a capacidade maternal e avaliar a possível transmissão destas características para a geração seguinte, utilizando um grupo de animais selecionados pela capacidade acima descrita e um grupo de controlo. Através de medições em animais jovens e respetivos progenitores, o autor foi capaz de concluir que há características maternais geneticamente transmissíveis, sendo provável que o mesmo aconteça com o temperamento dos animais.

Seria de esperar que ovinos mais reativos fossem também mais receosos, mas têm sido observado resultados contraditórios. Por exemplo (Beausoleil *et al.*, 2008) verificaram que ovinos mais ativos demonstram menos receio da proximidade com o operador, atravessando as zonas no teste de arena com maior frequência, ao passo que Nowak *et al.* (2006) observaram que ovinos provenientes de uma linhagem de animais calmos demonstravam um nível de stresse e agitação inferior durante o teste efetuado, enquanto os animais da linha nervosa expressaram maior movimentação. Com objetivo semelhante, Silveira *et al.* (2010) compararam 6 raças de ovinos quanto ao seu temperamento de um modo subjetivo, atribuindo um score consoante o comportamento dos animais dentro de um cercado. Os autores relacionaram os animais de aptidão cárnea a temperamentos mais

agitados, enquanto os animais de aptidão para a produção de lã foram classificados como mais calmos. Torna-se, então, relevante realizar mais estudos que relacionem este traço fenotípico que é o temperamento, com a genética dos animais, como fizeram Gutiérrez-Gil *et al.* (2008) ao interligarem traços do temperamento de bovinos com determinados genes, que podem variar consoante a raça.

### 2.3. O temperamento e a produção

Várias medições do temperamento animal apresentaram uma alta repetibilidade e uma forte relação com as características produtivas (Nowak *et al.*, 2006). No estudo de Murphy *et al.* (1994) o comportamento de ovelhas foi moderadamente correlacionado com componentes da conduta maternal. Através de uma série de experiências com bovinos de diferentes raças, Voisinet *et al.*, (1997) obtiveram uma relação entre o temperamento e diferentes raças de bovinos. Os animais de raças *Bos indicus* demonstraram ser mais temperamentais e ativos do que os de raça *Bos taurus*, pelo que os autores testaram a possibilidade de o temperamento ser um traço hereditário e que permanece inalterável quando os animais são testados ao longo do tempo, concluindo que tal é verdadeiro, por isso, a seleção dos animais consoante o seu temperamento pode ser uma das chaves na maximização da eficiência produtiva.

Também em bovinos, Silveira (2005) avaliou o efeito do genótipo na sua suscetibilidade ao stresse e o seu efeito na qualidade da carne, encontrando diferenças significativas entre as raças utilizadas, no caso, Aberdeen Angus e cruzados de Aberdeen Angus e Nelore. Os primeiros demonstraram menores valores na medição comportamental, que teve em consideração a atividade dos animais, as suas vocalizações, entre outros fatores, sendo os animais cruzados mais reativos. Neste estudo o autor constatou também que os animais mais reativos ganharam menos peso. As diferenças em termos de ganho médio diário podem estar relacionadas com maiores ou menos perdas de energia por parte dos animais. Em medições de temperatura corporal efetuada em ovinos da raça Merino verificaram-se diferenças entre animais de linhagem calma e nervosa. Os animais mais calmos demonstraram uma maior temperatura corporal, o que se poderá traduzir numa menor perda de energia e, consequentemente, um maior ganho médio diário (Henry *et al.*, 2010).

Ao estudar o comportamento de ovelhas de raça Tsigai, selecionadas com base no seu temperamento e a respetiva descendência, Pajor *et al.* (2010) observaram que as

fêmeas mais temperamentais (nervosas) produziam menor quantidade de leite e que a sua descendência apresentava menor ganho médio diário antes do desmame e, consequentemente, menor peso ao desmame. Por sua vez, os cordeiros descendentes de ovelhas calmas demonstraram maior ganho de peso, indicando que os testes de temperamento podem ser úteis para os produtores que pretendam aumentar o ganho médio diário e a produção de leite. As ovelhas de linhagem calma apresentaram valores de cortisol mais baixos, sugerindo que animais mais temperamentais tinham níveis de stresse mais elevados, aumentando a sua função adrenal e, consequentemente, a concentração de cortisol. Também num estudo de Pajor *et al.* (2008) os cordeiros com temperamento calmo demonstraram maior ganho médio diário e maior peso ao desmame. Resultados semelhantes foram observados com bovinos que demonstram uma relação entre temperamento e o ganho médio diário num estudo de Sebastian *et al.* (2011), cujos em que se observou um acréscimo de 76 g/dia em novilhos com temperamento mais calmo.

Também a produção de leite parece estar relacionada com o temperamento. Num estudo de Breuer *et al.* (2010), foi avaliada a relação entre produção de leite de bovinos Holstein Friesian e a interação homem-animal. Os animais com produções inferiores, assim como com as percentagens de proteína e gordura no leite mais baixas, apresentaram uma menor aproximação do operador durante o teste efetuado. Murray *et al.* (2006) também observaram uma maior produção de leite por parte de fêmeas de linhagem mais calma, demonstrando que a produção de leite está dependente do temperamento do animal.

Visto que a seleção em função do temperamento provoca mudanças na resposta ao stresse e este afeta o desenvolvimento intrauterino, esta pode afetar a sobrevivência embrionária (Blache *et al.*, 2010). Os mesmos autores afirmam que, no caso do rebanho estudado, a seleção dos animais em relação ao seu temperamento pode ter resultado numa co-seleção para altas taxas de ovulação. Já Hart *et al.* (2009) encontraram diferenças na concentração de imunoglobulina G no colostro de ovelhas selecionadas quanto ao seu temperamento, concluindo que os animais com temperamento calmo demonstram maiores concentrações de imunoglobulina G do que os animais nervosos, sugerindo que os cordeiros descendentes destas ovelhas têm mais hipóteses de sobrevivência. Cooke *et al.* (2012) encontraram diferenças significativas entre bovinos com temperamento nervoso e calmo, em termos reprodutivos. Bovinos com temperamento mais calmos apresentaram melhores taxas de conceção e maior número de animais ao desmame do que animais com temperamento nervoso.

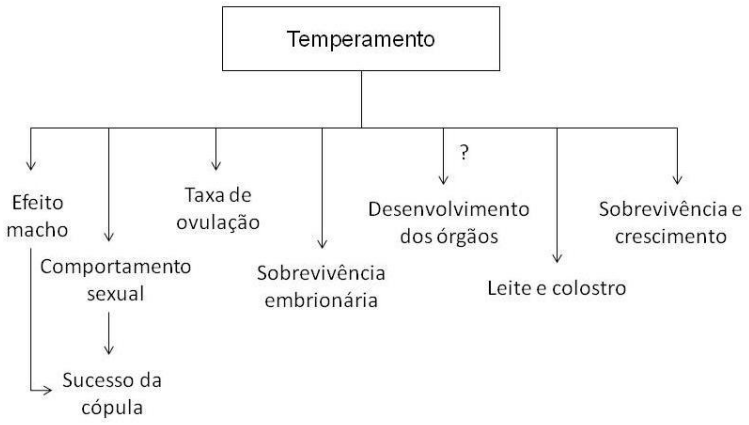



**Figura 1 –** Efeitos da seleção tendo em conta o temperamento (adaptado de Blache *et al.*, 2010)

A seleção dos ovinos, tendo em conta o temperamento, tem, portanto, efeito no comportamento reprodutivo das fêmeas, assim como na gestação e na sobrevivência dos recém-nascidos (Blache *et al.*, 2010) bem como no ganho médio diário (Pajor *et al.*, 2008). Torna-se por isso relevante aprofundar o conhecimento sobre o temperamento das diferentes espécies e raças, para que se possa obter um maior controlo sobre os parâmetros reprodutivos e reprodutivos que parecem estar dependentes, em parte, deste fator (Figura 1).

## 2.4. O cortisol como indicador fisiológico associado ao temperamento

Existem vários trabalhos de avaliação do temperamento dos animais que combinam indicadores de comportamento com indicadores fisiológicos, com destaque para o cortisol (ver revisões de Forkman *et al.*, 2007; Dodd *et al.*, 2012;). Quando um animal é exposto a um estímulo de stresse, o sistema nervoso autónomo inicia uma resposta rápida, induzindo respostas como elevação da temperatura corporal e taquicardia. Também se verificam modificações comportamentais, como imobilizações, agressões ou tentativas de fuga (Ferguson *et al.,* 2008). O eixo hipotálamo-hipófise-glândula adrenal (HHA) é ativado, manifestando-se através da síntese de cortisol pela glândula adrenal. Segundo Kirschbaum *et al.* (2000) são necessários vários minutos até que o eixo HHA dê uma resposta ao estímulo, podendo a resposta do cortisol demorar entre 5 a 20 minutos. O cortisol é libertado na corrente sanguínea, onde circula ligado a transportadores, apenas uma pequena fração (2-15%) permanece livre (Kirschbaum *et al.*, 2000).

Os ovinos não aparentam ter um ritmo circadiano do cortisol plasmático e são encontradas flutuações entre indivíduos (Basset, 1974), no entanto, Andersson *et al.* (2005) observaram um ritmo diurno desta hormona em ovinos sob o efeito de um fotoperíodo diurno. Parece existir uma tendência para se encontrarem as concentrações mais altas de cortisol pela manhã, tanto nos animais adultos como nos jovens (Parraguez *et al.*, 1989). Também Lee *et al.*, (2014) encontraram níveis mais elevados de cortisol em ovinos nas primeiras horas da manhã.

Aparte da sua relação com situações de stresse e temperamento, o nível plasmático de cortisol parece ter uma variação sazonal, devido à mudança de temperatura ao longo do ano. Uma temperatura ambiente mais elevada, principalmente se associada a humidade relativa superior, provoca a elevação dos níveis de cortisol (Starling *et al.*, 2005). Segundo estes autores, nos meses de Outono e Inverno os níveis de cortisol são menores, ocorrendo o contrário no Verão, quando as temperaturas são mais elevadas e os animais sentem desconforto térmico.

Como o cortisol está associado à resposta ao medo, é utilizado por diversos autores como indicador em testes que pretendem determinar qual a resposta fisiológica a situações de stresse. Burdick *et al.* (2010) estudaram o efeito do transporte de bovinos, juntamente com o seu temperamento, nas concentrações de cortisol. O temperamento calmo surgiu, neste estudo, associado a uma menor concentração de cortisol, tanto anterior como posterior ao transporte. Também num estudo efetuado em novilhos foram encontrados

níveis de cortisol mais elevados nos animais que demonstravam ter um temperamento mais agitado (Cafe *et al.*, 2011). Estes autores verificaram que existe uma ligação não só entre o nível de cortisol e o estímulo apresentado, neste caso o transporte, mas igualmente com o temperamento dos animais. Também diferentes raças de ovinos demonstraram ter diferentes relações com os níveis de cortisol plasmático. Ovinos de raças utilizadas para produção extensiva aparentam uma maior suscetibilidade ao stresse causado pelo transporte, tendo níveis de cortisol mais elevados (Hall *et al.*, 1998). O estudo evidencia que pode ter ocorrido uma evolução das raças de ovinos utilizados em sistemas intensivos, de modo a terem respostas menores a situações de stresse, o que relaciona a fisiologia e o genótipo.

# 3. Trabalho experimental

## 3.1. Material e métodos

O trabalho experimental foi realizado nas instalações do Departamento de Zootecnia da UTAD – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, em Vila Real (41º 17' 18.52''N 7º 44' 31.97''O). Esta instituição possui duas raças de ovinos, a raça local Churra da Terra Quente e a raça exótica Ile-de-France. Para o trabalho foram utilizadas 10 ovelhas adultas (idade entre 4 e 6 anos), distribuídas por dois grupos estáveis (5 da raça Churra da Terra Quente e 5 da raça Ile-de-France), previamente formados. Os ovinos de raça Ile-de-France pesavam 55,8 ± 1,6 kg, e tinham uma condição corporal entre 4 e 4,5. Os animais da raça Churra da Terra Quente apresentaram um peso de 37,8 ± 2,1 kg e uma condição corporal entre 3 e 3,5. O estudo foi efetuado entre 21 de Janeiro e 14 de Fevereiro de 2014.

## 3.2. Maneio e Medições

Os animais foram colocados em duas salas de (3 m x 3 m), uma sala para cada grupo. Os animais foram levados do ovil para estas salas uma semana antes do início do trabalho experimental como período de habituação. Em cada sala foram realizados sempre os mesmos procedimentos de maneio. Todos os dias às 8 da manhã foram distribuídos 250 g animal$^{-1}$ dia$^{-1}$ de alimento concentrado e feno *ad libitum*. Os animais tinham água limpa sempre disponível.

Para o teste foi utilizada uma arena de 6 m de comprimento por 1,5 m de largura (anexo A). Foram marcados nas paredes intervalos de 1 m que foram utilizados como referência para a determinação da atividade de locomoção dos animais na arena.

Os testes foram realizados ao longo de 3 semanas. Em cada semana os testes foram realizados em 4 dias (2 dias para cada grupo). Em cada dia eram testados 4 animais, individualmente, sendo feita recolha de sangue em 3. Não foram realizados testes a todos os animais por motivos práticos, contudo os grupos não sofreram alterações para que não se perturbasse o período de habituação dos animais. O estudo individual dos animais permitiu não só reduzir o número de animais necessários, assim como o risco de comportamentos individuais serem dissimulados pelos comportamentos do grupo (Erhard *et al.*, 2006).

Em todos os testes foram efetuadas recolhas de sangue antes e depois do teste da arena em 3 animais. As recolhas de sangue foram realizadas por um operador com larga experiência, que não o operador presente no teste, como indicado por Beausoleil *et al.* (2008) e Beausoleil *et al.* (2012).Os animais utilizados neste estudo não foram sujeitos a nenhum outro tipo de maneio específico anterior ao período de testes pelo operador presente no teste. Com este procedimento garantiu-se que os animais em teste não estavam familiarizados com o operador e com o local de teste como indicado por Erhard *et al.* (2006).

### 3.2.1. Método utilizado

O teste utilizado foi um teste de arena com operador estacionário. Este teste consistia na presença de um operador na zona zero de um corredor dividido em 6 zonas de um metro cada. O animal era então colocado no local de teste durante 10 minutos, permanecendo o operador na zona zero, imóvel durante todo o teste, sem olhar diretamente para o animal, como indicado por Beausoleil *et al.* (2008), e como se ilustra na Figura 2.

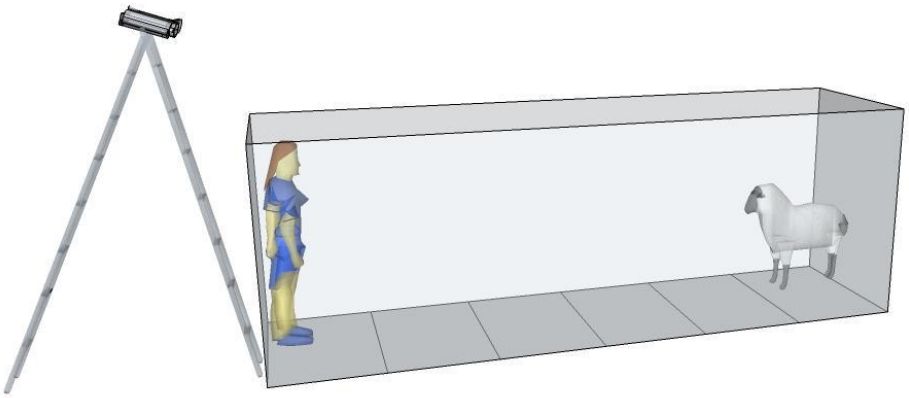


**Figura 2 –** Arena de teste. Elaboração própria.

O operador utilizou a mesma roupa em todos os testes para que não houvesse interferência deste fator (Beausoleil *et al.*, 2008; Beausoleil *et al.*, 2012). Todos os testes foram gravados com uma máquina de filmar (Sony, DCR-SX31). Esta máquina foi montada num ponto elevado de modo a que toda a arena de teste fosse enquadrada nos filmes. Os filmes foram descarregados para um computador para posterior análise do comportamento.

### 3.2.2. Análise do comportamento durante o teste

Os comportamentos foram avaliados através dos filmes realizados durante os testes. Foram avaliados os seguintes comportamentos incluídos num etograma (Quadro 1): distância percorrida, tempo na zona zero, número de vocalizações altas, número de vocalizações baixas, número de olhares de relance, número de olhares fixos, número de vezes que cheirou o operador, número de vezes que cheirou o chão ou paredes, reticência em cheirar o operador, reticência em vocalizar alto, reticência em vocalizar baixo, número de vezes que defecou ou urinou e número de tentativas de fuga. No total foram realizados e analisados 480 minutos de filmagem. Os comportamentos foram anotados num ficheiro Excel à medida que as filmagens efetuadas iam sendo visualizadas. A Figura 3 ilustra a colocação do operador e a arena de teste.

**Figura 3 –** Exemplo de imagens analisadas dos testes efetuados com CTQ (à esquerda) e IF (à direita). Elaboração própria.

No Quadro 1 apresenta-se o etograma utilizado. Este etograma foi construído com base na bibliografia existente sobre o assunto com destaque para os trabalhos de Beausoleil *et al.* (2008), Deiss *et al.* (2009) e Freitas (2014).

**Quadro 1 –** Etograma de comportamentos.

| Comportamento | Definição |
|---|---|
| **Distância percorrida** | Metros percorridos pelo animal em atividade locomotora durante o teste em m $min^{-1}$ |
| **Tempo na zona zero** | Tempo (em minutos) que o animal passou na zona zero |
| **Vocalizações altas** | Vocalizações produzidas com a boca aberta |
| **Vocalizações baixas** | Vocalizações produzidas com a boca fechada |
| **Olhares de relance** | O animal olhou para o operador durante um tempo inferior a 3 segundos |
| **Olhares fixos** | O animal olhou para o operador durante um tempo superior a 3 segundos |
| **Cheirou o operador** | O animal aproximou-se e cheirou o operador |
| **Cheirou o chão ou as paredes** | O animal aproximou-se e cheirou o chão ou as paredes |
| **Reticência em cheirar o operador** | Tempo (em minutos) até à primeira vez que o animal cheirou o operador |
| **Reticência em vocalizar alto** | Tempo (em minutos) até à primeira vez que o animal vocalizou alto |
| **Reticência em vocalizar baixo** | Tempo (em minutos) até à primeira vez que o animal vocalizou baixo |
| **Defecou ou urinou** | Número de vezes que o animal defecou ou urinou durante o teste |
| **Tentativa de fuga** | O animal colocou pelo menos duas das patas nas paredes ou saltou com o intuito de escapar |

### 3.2.3. Análise da atividade locomotora

Para calcular a distância percorrida pelo animal durante o teste (atividade locomotora) foi efetuado um desenho à escala da arena de teste no qual foi traçado o movimento de cada animal durante os minutos 1, 3, 5 , 7 e 9 de cada filmagem (Figura 4).

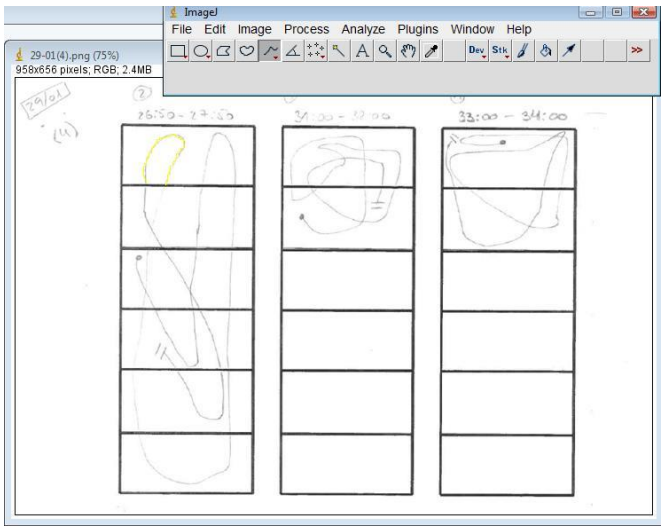



**Figura 4 –** Exemplo do desenho da arena de teste com o percurso traçado e com o *layout* da análise de imagem no programa ImageJ. Elaboração própria.

Com a análise das imagens foram obtidos dados sobre a distância percorrida pelos animais durante o teste. Na Figura 5 apresenta-se um exemplo dos dados obtidos pelo programa ImageJ (Version 1.47; National Institutes of Health, USA) e que posteriormente foram transferidos para o programa Excel.

### 3.2.4. Análise do cortisol

A determinação do cortisol foi realizada a partir do plasma do sangue. As recolhas de sangue foram efetuadas através de venopunção na veia jugular para tubos com heparina. Como foi referido anteriormente esta operação foi realizada por um operador com larga experiência pelo que esta recolha ocorreu de forma rápida (sempre com duração inferior a 2 minutos), para que não haja alteração dos níveis de cortisol no plasma, como sugerido por Beausoleil *et al.* (2008) e como defendem Broom *et al.* (1993) qualquer tratamento pode ser medido desde que a colheita de sangue seja feita de forma rápida. No total foram recolhidas

72 amostras. As amostras de sangue recolhidas foram centrifugadas durante 15 minutos a 3000 rpm (Hermle Z 320) e o plasma pipetado para Eppendorfs devidamente etiquetados e que foram congelados (Figura 6), a -70˚C numa arca congeladora (Forma Scientific, modelo 8525) para posterior análise.

**Figura 5 –** Amostras de plasma congelado. Elaboração própria.

A análise dos níveis de cortisol foi efetuada utilizando o Immulite® Cortisol Kit (Siemens 06601528, LKCO1), um sistema de imunoensaio quimioluminescente. Para um primeiro passo procedeu-se à calibração do aparelho Immulite® (Figura 7), seguindo-se, posteriormente, a passagem dos ajustes de cortisol pelo sistema, para que este reconhecesse os máximos e mínimos que poderiam ser lidos nos testes posteriores (1-50 µg/dL).

**Figura 6 –** Sistema Immulite®. Elaboração própria.

De seguida procedeu-se ao teste das amostras de plasma recolhido, sendo pipetados 10 µg de cada amostra para cuvetes próprias para o efeito, numeradas com códigos de barras, para que pudessem ser identificadas pelo aparelho (Figura 8).

**Figura 7 –** Amostras prontas para serem analisadas pelo sistema Immulite®. Elaboração própria.

As amostras foram retiradas do congelador pouco tempo antes da realização do teste, de forma a que pudesses ser feito um controlo do tempo de descongelação como sugerido por Mormède *et al.* (2007). À medida que as amostras passam no sistema de leitura, que é constantemente monitorizado (Figura 9), são determinados os níveis de cortisol, sendo produzindo um ficheiro com essa informação. Os dados relativos ao nível de cortisol foram posteriormente colocados numa folha de Excel para a análise estatística.

**Figura 8 –** Monitorização da leitura das amostras do sistema Immulite®. Elaboração própria.

### 3.2.5. Análise estatística

Para cada grupo foram realizados 3 testes com duas repetições cada. A análise da atividade de locomoção e dos comportamentos foi realizada por um fatorial em que se estudaram como efeitos a raça e o tempo. Para a análise do nível de cortisol foram considerados como efeitos a raça e o momento da recolha de sangue. As análises foram realizadas recorrendo ao programa JMP-SAS (Version 5.1; SAS Institute Inc. Cary, NC, USA). A comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey HSD (Tukey-Kramer Honestly Significant Difference) e pelo teste Fisher-PLSD (Fisher´s Protected Least Significant Difference).

## 3.3. Resultados e discussão

### 3.3.1. Distância percorrida (atividade de locomoção)

O Quadro 2 apresenta os resultados que foram obtidos para a distância percorrida (atividade de locomoção) pelos animais de cada raça durante os testes na arena cada ao longo do tempo (semanas).

**Quadro 2 –** Distância percorrida pelos animais durante o período de teste (m min.$^{-1}$).

| Efeito | Distância percorrida (m min.-1) |
|---|---|
| **Raça (R)** | |
| IF | 2,86 [a] |
| CTQ | 2,31 [b] |
| **Tempo (T)** | |
| S1 | 3,76 [a] |
| S2 | 1,99 [b] |
| S3 | 1,99 [b] |
| **Probabilidade** | |
| Raça (R) | <,001 |
| Tempo (T) | <,001 |
| R x S | <,001 |

Para a raça e para o tempo, médias com diferente letra representam valores significativamente diferentes (P < 0,05)

Verifica-se que há um efeito significativo (P < 0,001) da raça e do tempo na distância percorrida pelas ovelhas durante o teste. A comparação de médias mostra que há diferenças significativas (P < 0,05) entre as duas raças utilizadas neste estudo em termos de distância percorrida. Os animais da raça CTQ percorreram menos 19% da distância (cerca de meio metro) que os animais IF. Num estudo de Silva *et al.* (2009) observaram-se resultados semelhantes em borregos destas raças. Nesse trabalho observou-se que os borregos IF demonstraram maior atividade na arena de teste que borregos da mesma idade da raça CTQ. Estes resultados vão de acordo ao observado neste estudo com animais adultos. Também Freitas (2014) encontrou diferenças significativas entre raças de ovinos na sua atividade de locomoção, medida através do número de quadrados pisados pelo animal numa arena de teste (43 *vs* 36; P < 0,01). Os resultados encontrados no presente trabalho

indicam que as ovelhas da raça IF, ovelha de tipo carne, são mais reativas e que sugere menor capacidade de adaptação ao teste da arena. Estes resultados vão de encontro ao verificado por Silveira *et al.* (2010) que num trabalho com 6 raças verificou que os animais de aptidão carne apresentaram um comportamento mais reativo que animais de aptidão para lã.

Verifica-se também que ao longo do tempo há uma tendência para menor atividade ($P < 0,05$). De facto, na S1 as ovelhas mostraram maior atividade que nas S2 e S3 (3.76 vs 1.99 m $min^{-1}$, respetivamente). Este padrão também foi observado por Cafe *et al.* (2011), que realizaram várias medições de comportamento associado à atividade locomotora em duas raças de bovinos, incluindo a velocidade de fuga. Estes autores verificaram que após três sessões de teste as medidas obtidas mostraram um comportamento de estabilização, o que foi atribuído à familiarização dos animais com o teste e com o operador. Também Silveira (2005) observou que os animais aparentam uma habituação às situações de teste a partir da primeira vez que são confrontados com a mesma e ainda a este propósito Curley *et al.* (2006) afirmam que existe um limite à habituação por parte dos animais a um determinado estímulo, a partir do qual ocorre uma estabilização dos comportamentos. Apesar de esta evolução ser evidente nos animais de ambas as raças, é mais percetível nos animais de raça IF para a primeira semana em que se verifica uma diferença significativa na atividade de locomoção entre os animais daquela raça e os da raça CTQ (Figura 10).

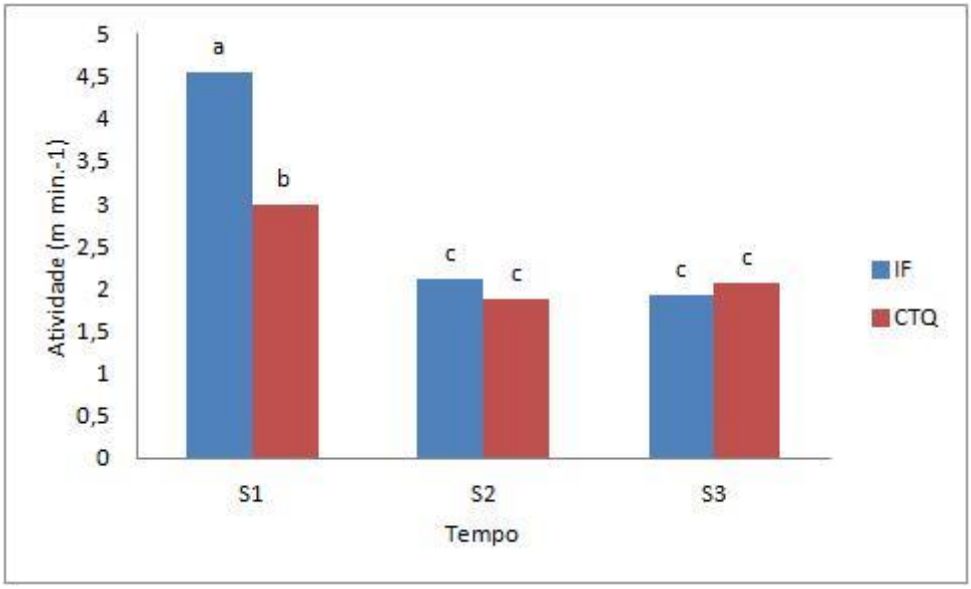



**Figura 9 –** Atividade (m min.-1) das ovelhas IF e CTQ ao longo do tempo. Barras encimadas com letras diferentes são significativamente diferentes ($P < 0,05$). Elaboração própria.

### 3.3.2. Indicadores de comportamento

A análise dos comportamentos que os animais efetuaram durante o teste é apresentada no Quadro 3.

**Quadro 3 –** Frequência ou duração dos comportamentos dos animais durante o teste.

| Comportamentos | Tempo (T) | | | Raça (R) | | Probabilidade | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | S1 | S2 | S3 | IF | CTQ | T | R | T x R |
| **Tempo na zona 0** | 0,372 | 0,918 | 1,462 | 1,095 | 0,739 | 0,076 | 0,353 | 0,611 |
| **Vocalizações altas** | 43,0 | 29,6 | 26,6 | 48,2[a] | 18,0[b] | 0,181 | 0,001 | 0,430 |
| **Vocalizações baixas** | 2,19 | 1,41 | 0,630 | 0,125[b] | 2,69[a] | 0,413 | 0,011 | 0,352 |
| **Olhar de relance** | 39,7 | 40,1 | 48,4 | 44,0 | 41,4 | 0,183 | 0,545 | 0,761 |
| **Olhar fixo** | 12,3 | 10,3 | 6,50 | 8,38 | 11,0 | 0,054 | 0,180 | 0,729 |
| **Cheirou o operador** | 1,77 | 3,17 | 3,13 | 3,33 | 2,04 | 0,447 | 0,212 | 0,195 |
| **Cheirou o chão ou paredes** | 13,2 | 16,0 | 17,8 | 13,2 | 18,3 | 0,473 | 0,111 | 0,882 |
| **Reticência em cheirar o operador** | 7,02 | 5,96 | 5,96 | 6,30 | 6,32 | 0,664 | 0,980 | 0,168 |
| **Reticência em vocalizar alto** | 2,10 | 2,33 | 3,92 | 0,642[b] | 4,92[a] | 0,324 | 0,001 | 0,953 |
| **Reticência em vocalizar baixo** | 4,80 | 6,93 | 8,27 | 7,73 | 5,60 | 0,077 | 0,094 | 0,325 |
| **Defecou ou urinou** | 0,354 | 0,214 | 0,188 | 0,125 | 0,379 | 0,553 | 0,066 | 0,146 |
| **Tentativa de fuga** | 0,125 | 0,339 | 0,250 | 0,250 | 0,226 | 0,725 | 0,913 | 0,304 |

Para a raça e para a semana, médias com diferente letra representam valores significativamente diferentes (P < 0,05)

Da análise dos indicadores de comportamento verifica-se que não há efeito (P > 0,05) do tempo e que o efeito (P < 0,01) raça só foi verificado nas vocalizações altas, baixas e na reticência em vocalizar alto. Verifica-se que os animais IF realizaram um maior número (P < 0,05) de vocalizações altas por sessão de teste que as ovelhas CTQ (48 *vs* 18, respetivamente). Estes resultados são comparáveis aos reportados por Beausoleil *et al.* (2008) num trabalho em que estudaram animais de uma linha calma e de uma linha ativa. Na verdade, estes autores encontraram diferenças no número de vocalizações altas entre os animais dos rebanho de linha calma e ativa, com os animais deste última linha a apresentarem uma maior (P < 0,05) frequência de vocalizações altas. Apesar de este trabalho não ser próximo do nosso, os resultados encontrados estão em acordo com a nossa hipótese de que os animais de raça IF são mais ativos que os da raça CTQ. Este comportamento mais ativo foi já verificado pela atividade locomotora, mas que como

apontam Wolf *et al.* (2008) a moderada correlação entre a vocalização e a locomoção não permite ter uma ideia clara daquela relação. Também Nowak *et al.* (2006) encontraram diferenças na vocalização alta entre ovinos de linhas calma e ativa, tendo os primeiros vocalizado alto mas em menor número. Este aspeto pode estar relacionado com o medo ou nervosismo (Erhard *et al.*, 2006). Para além das vocalizações altas também foram encontradas diferenças ($P < 0,05$) entre os animais das raças IF e CTQ para as vocalizações baixas (0,125 *vs* 2,69 para a IF e CTQ, respetivamente). Este resultado está em contradição com o verificado por Beausoleil *et al.* (2008). Estes autores não verificaram diferenças significativas ($P = 0,303$) nas vocalizações baixas entre as ovelhas mais ativas e as menos ativas.

Visto que a presença de um humano está muito associada a dois tipos de reações dos ovinos, imobilização e olhar de relance (atitude defensiva passiva) ou locomoção e vocalização (atitude defensiva ativa) (Vandenheede *et al.*, 1998), podemos afirmar que os dois tipos de atitudes foram observados neste trabalho experimental por parte dos animais de ambas as raças. O comportamento de reticência em vocalizar alto também apresenta diferenças significativas ($P < 0,05$), sendo este tempo maior para os animais CTQ (4,92 minutos) do que para os IF (0,642 minutos). Estes resultados demonstram que os animais CTQ se mostram mais calmos, ao contrário dos IF, estando de acordo com os resultados encontrados no estudo de Beausoleil *et al.* (2008) no qual os animais mais ativos também tinham um menor tempo ($P = 0,03$) até à primeira vocalização que os animais mais calmos (6.6 min. *vs* 4.5 min., respetivamente).

Existem também outras diferenças entre comportamentos que, embora não sendo significativas, mostram uma tendência para a diferença, o que merece alguma atenção. É o caso do tempo despendido pelo animal na zona 0, em que há uma tendência ($P = 0,076$) para um aumento com o tempo o que pode estar ligado à habituação ao teste assim como ao espaço e até ao operador. Esta inferência foi também apresentada por outros (Hemsworth *et al.*, 2000) em que houve alteração do comportamento dos animais devido à repetição da exposição ao operador num contexto não associado a experiências negativas ou positivas.

Também o número de vezes que os animais olharam fixamente para o operador ao longo do tempo é merecedora de atenção. Para este comportamento há uma tendência ($P = 0,054$) para a sua diminuição ao longo do tempo o que pode ser explicado pela crescente habituação ao operador e pelo ambiente da arena de teste (Erhard *et al.*, 2006).

### 3.3.3. Indicador fisiológico cortisol

O efeito da raça e do momento de recolha de sangue (antes e depois do teste da arena) no nível de cortisol plasmático apresenta-se no Quadro 4.

**Quadro 4 –** Nível de cortisol plasmático (µg $dL^{-1}$) para as ovelhas CTQ e IF e para o momento da recolha.

| Efeito | Cortisol (µg $dL^{-1}$) |
|---|---|
| **Raça (R)** | |
| IF | 2,60 [a] |
| CTQ | 2,09[b] |
| | |
| **Momento da recolha (MR)** | |
| Antes do teste (AT) | 1,016 [b] |
| Depois do teste (DT) | 3,684 [a] |
| | |
| **Probabilidade** | |
| R | 0,012 |
| MR | <,0001 |
| R x MR | 0,052 |

Para a raça e para o momento de recolha de sangue, médias com diferente letra representam valores significativamente diferentes (P < 0,05)

Os resultados encontrados mostram que há um efeito da raça (P = 0,012) e do momento da recolha (P = 0,001) no nível de cortisol plasmático. Relativamente à raça encontraram-se diferenças significativas (P < 0,05) entre as duas raças de ovinos no nível de cortisol, sendo que os animais IF demonstraram uma maior reação fisiológica ao stresse causado pelo teste, do que os animais CTQ. Estes resultados dão suporte à hipótese apresentada, de que os ovinos de raça IF seriam os mais nervosos ou ativos, ou seja, que apresentam maior reação de stresse ao teste o que é verificado pela elevação de cortisol como resultado de uma resposta fisiológica do eixo hipotálamo-hipófise-glândula adrenal. Há vários trabalhos que vão de encontro a este resultado e que mostra que a determinação do cortisol é muito relevante para estudar o temperamento dos animais. Por exemplo Pajor *et al.* (2010) encontraram resultados que relacionam o nível de cortisol com o temperamento de ovelhas da raça Tsigai. Neste trabalho foi verificado que o nível de cortisol está altamente relacionado com o temperamento (r = 0,79; P < 0,001) e que as ovelhas calmas apresentaram um valor de cortisol 66% mais baixo que as ovelhas mais nervosas. Também

Goddard *et al.* (2000), que testaram ovinos de diferentes raças observaram a existência de uma relação entre o genótipo e o nível de cortisol medido após serem efetuados testes de temperamento. Estes resultados foram também verificados noutras espécies em que animais mais agressivos ou nervosos apresentam, por norma, níveis mais elevados de cortisol (King *et al.*, 2006; Cooke *et al.*, 2012).

Comparando os momentos de recolha de sangue (antes e depois do teste), podemos observar que existem diferenças significativas ($P < 0,001$). Os animais de ambas as raças reagiram, de facto, ao teste efetuado, tendo ocorrido um aumento nos níveis de cortisol com a realização do teste. Esta alteração do nível de cortisol depois de expor os animais a stresse tem sido observada em numerosos trabalhos (Waiblinger *et al.*, 2006) e que em situações de stresse mais prolongado podem ocorrer alterações no peso e morfologia das glândulas adrenais (Hemsworth *et al.*, 2000). Para além dos testes que arena o transporte é também um exemplo em que o animal é exposto a uma situação de stresse cuja resposta do eixo HHA conduz a um aumento do cortisol. Foi o que verificaram Hall *et al.* (1998) que estudaram o efeito do transporte no nível de cortisol em ovinos de diferentes raças, tendo observado um grande aumento desta hormona glucocorticoide com os procedimentos associados ao transporte.

Também foi observado uma interação ($P = 0,05$) entre a raça e o momento de recolha (Figura 11). Os animais IF aparentam um maior nervosismo no pós-teste, em relação aos CTQ o que é traduzido pela diferença entre os níveis de cortisol (3,2 *vs* 4,1; $P < 0,05$; para a CTQ e IF respetivamente). Ao contrário do observado no presente trabalho Beausoleil *et al.* (2008), verificaram que os animais mais ativos apresentaram um menor nível de cortisol após o teste que os animais do grupo menos ativo. Tal como no presente trabalho, estes autores também não encontraram diferenças no nível de cortisol entre os dois grupos de animais antes dos testes. Já em bovinos foram descritos resultados similares (Boissy *et al.* 1997). Neste trabalho foram comparadas duas raças (Friesian *vs* Aubrac) no qual todos os animais demonstraram uma subida no nível do cortisol após o teste e os animais da raça Aubrac, considerada mais ativa, apresentou valores mais elevados ($P < 0,01$) de cortisol (18,9 *vs* 39,6 $ngml^{-1}$). Também em concordância com os nossos resultados, Caroprese *et al.* (2012), estabeleceram uma relação entre genótipo e o nível de cortisol após testes semelhantes aos efetuados neste estudo, encontraram no final do teste valores de cortisol mais elevados para os animais mais agitados. Estes autores concluíram a utilidade da utilização do cortisol como indicador de temperamento já que como não foram observadas diferenças entre raças no nível de cortisol antes do teste pode dizer-se que o teste permitiu avaliar qual das duas raças tem uma maior suscetibilidade ao stresse, ou seja, permite

identificar qual a que apresenta um temperamento mais ativo ou nervoso. Uma conclusão semelhante pode ser retirada do presente trabalho.

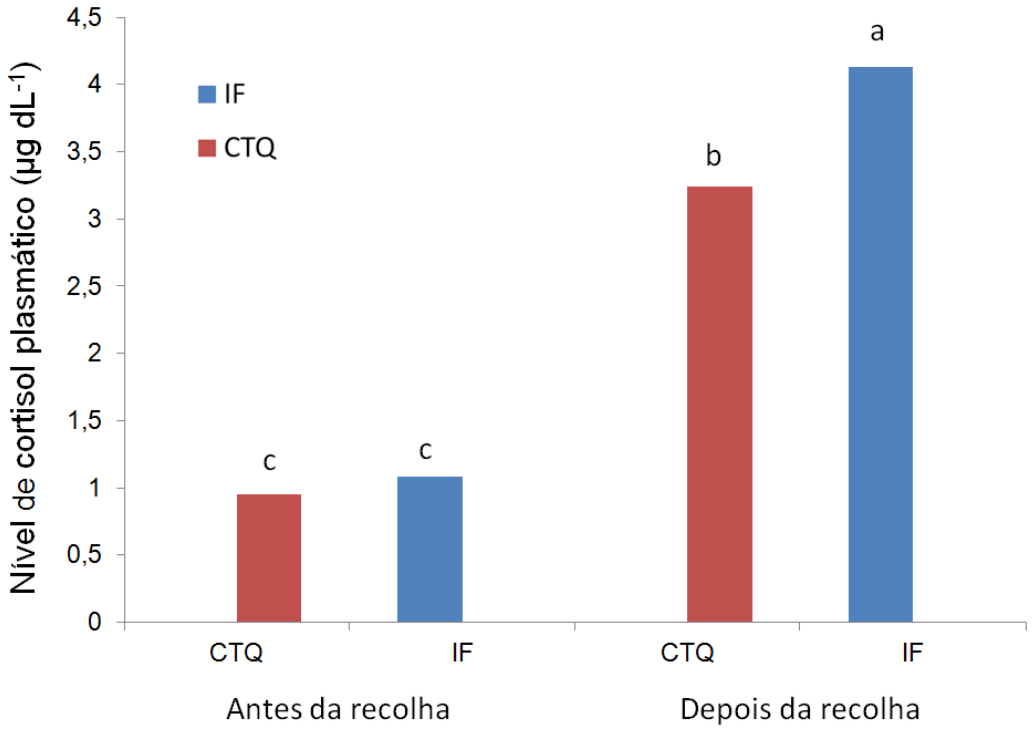



**Figura 10 –** Nível de cortisol plasmático (µg dL-1) para as ovelhas CTQ e IF e para o momento da recolha. Barras encimadas com letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05). Elaboração própria.

## 4. Considerações finais

Com este estudo é possível concluir que existem diferenças de temperamento entre os ovinos das raças Churra da Terra Quente e Ile-de-France e que os testes utilizados são relevantes para esse conhecimento. Os resultados obtidos, sugerem que os ovinos Ile-de-France são mais reativos exigindo, por isso, uma maior atenção no seu maneio.

Este tipo de teste, sendo relativamente simples, possibilita o conhecimento do comportamento e reação dos animais de produção. Este conhecimento pode ser aplicado na escolha dos animais cujo temperamento seja mais calmo, tendo em conta que esta decisão deverá ser efetuada quando estabelecida uma comparação entre animais da mesma raça, o que terá implicações na otimização do trabalho e na resposta produtiva dos animais.

Finalmente este trabalho mostra a necessidade de aprofundar e aplicar este tipo de abordagem em ambiente de produção quer em sistemas intensivos quer em sistemas extensivos de forma a otimizar as práticas de maneio e a sua relação com o bem-estar dos animais.

## 5. Bibliografia


Andersson, H., Johnston, J. D., Messager, S., Hazlerigg, D., Lincoln, G. (2005). Photoperiod regulates clock gene rhythms in the ovine liver. *General and Comparative Endocrinology*, *142*(3): 357-363.

Bassett, J. M. (1974). Diurnal patterns of plasma insulin, growth hormone, corticosteroid and metabolite concentrations in fed and fasted sheep. *Australian Journal of Biological Sciences 27*(2): 167-182.

Beausoleil, N. J., Blache, D., Stafford, K. J., Mellor, D. J., Noble, A. D. L. (2008). Exploring the basis of divergent selection for 'temperament' in domestic sheep. *Applied Animal Behaviour Science 109*(2–4): 261-274.

Beausoleil, N. J., Blache, D., Stafford, K. J., Mellor, D. J., Noble, A. D. (2012). Selection for temperament in sheep: Domain-general and context-specific traits. *Applied Animal Behaviour Science*, *139*(1): 74-85.

Blache, D., Bickell, S. L. (2010). Temperament and reproductive biology: emotional reactivity and reproduction in sheep. *Revista Brasileira de Zootecnia 39*: 401-408.

Boissy, A., Le Neindre, P. (1997). Behavioral, cardiac and cortisol responses to brief peer separation and reunion in cattle. *Physiology & Behavior 61*(5): 693-699.

Breuer, K., Hemsworth, P., Barnett, J., Matthews, L., Coleman, G. (2000). Behavioural response to humans and the productivity of commercial dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science 66*(4): 273-288.

Broom, D. M., Johnson, K. G. (1993) Stress and Animal Welfare. *Chapman and Hall*, London.

Brown, J., Mandell, I., deLange, C., Purslow, P., Robinson, J. A., Squires, J., Widowski, T. (2008). Relationship between a pig's temperament and handling experience, and measures of stress at slaughter and meat quality. *Allen D. Leman Swine Conference*.

Burdick, N., Carroll, J., Hulbert, L., Dailey, J., Willard, S., Vann, R., Welsh Jr, T., Randel, R. (2010). Relationships between temperament and transportation with rectal temperature and serum concentrations of cortisol and epinephrine in bulls. *Livestock Science 129*(1): 166-172.

Cafe, L., Robinson, D., Ferguson, D., McIntyre, B., Geesink, G., Greenwood, P. (2011). Cattle temperament: Persistence of assessments and associations with productivity, efficiency, carcass and meat quality traits. *Journal of Animal Science 89*(5): 1452-1465.

Caroprese, M., Napolitano, F., Boivin, X., Albenzio, M., Annicchiarico, G., Sevi, A. (2012). Development of affinity to the stockperson in lambs from two breeds. *Physiology & Behavior 105*(2): 251-256.

Cooke, R. F., Bohnert, D. W., Cappellozza, B. I., Mueller, C. J., DelCurto, T. (2012). Effects of temperament and acclimation to handling on reproductive performance of Bos taurus beef females. *Journal of Animal Science*, *90*(10), 3547-3555.

Cloete, J. J. E., Cloete, S. W. P., Scholtz, A. J., & Hoffman, L. C. (2014). Behaviour response of Namaqua Afrikaner, Dorper and South African Mutton Merino lambs towards humans. *South African Journal of Animal Science*, *43*(5): 121-125.

Curley, K., Paschal, J., Welsh, T., Randel, R. (2006). Technical note: Exit velocity as a measure of cattle temperament is repeatable and associated with serum concentration of cortisol in Brahman bulls. *Journal of Animal Science 84*(11): 3100-3103.

Deiss, V., Temple, D., Ligout, S., Racine, C., Bouix, J., Terlouw, C., Boissy, A. (2009). Can emotional reactivity predict stress responses at slaughter in sheep?. *Applied Animal Behaviour Science 119*(3): 193-202.

Dodd, C. L., Pitchford, W. S., Hocking Edwards, J. E., Hazel, S. J. (2012). Measures of behavioural reactivity and their relationships with production traits in sheep: A review. *Applied Animal Behaviour Science 140*(1): 1-15.

Erhard, H. W., Elston, D. A., Davidson, G. C. (2006). Habituation and extinction in an approach–avoidance test: An example with sheep. *Applied Animal Behaviour Science 99*(1): 132-144.

Ferguson, D., Warner, R. (2008). Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? *Meat Science 80*(1): 12-19.

Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salaün, M. C., Canali, E., & Jones, R. B. (2007). A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiology & Behavior*, *92*(3): 340-374.

Fraser, D., Duncan, I. J. H., Edwards, S. A., Grandin, T., Gregory, N. G., Guyonnet, V., Hemsworth, P. H., Huertas, S. M., Huzzey, J. M., Mellor, D. J., Mench, J. A., Špinka, M., Whay, H. (2013). General Principles for the welfare of animals in production systems: The underlying science and its application. *The Veterinary Journal 198*: 19–27.

Freitas, A. C. B. (2014). Avaliação do temperamento de ovinos com treinamento de estímulo tátil e deslocamento com auxílio de cabresto. *Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios – Instituto de Zootecnia, São Paulo.*

Goddard, P. J., Fawcett, A. R., Macdonald, A. J., Reid, H. W. (2000). The behavioural, physiological and immunological responses of lambs from two rearing systems and two genotypes to exposure to humans. *Applied Animal Behaviour Science 66*(4): 305-321.

Gómez, J. M. D. (2007). Temperamento de três raças de ovinos submetidos a diferentes manejos de pastagem. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*.

Gonzaga, M. D., Lorenzo, D. D. (2010). Relation of milk yield and time of milking on the temperament and milk let-down characteristics of Bulgarian Murrah buffalo. *Italian Journal of Animal Science*, *6*(2s): 1308-1311.

Grandin, T. (1998). Review: Reducing handling stress improves both productivity and welfare. *The professional Animal scientist 14*(1): 1-10.

Gutiérrez-Gil, B., Ball, N., Burton, D., Haskell, M., Williams, J. L., Wiener, P. (2008). Identification of quantitative trait loci affecting cattle temperament. *Journal of Heredity 99*(6): 629-638.

Hall, S., Broom, D., Kiddy, G. (1998). Effect of transportation on plasma cortisol and packed cell volume in different genotypes of sheep. *Small Ruminant Research 29*(2): 233-237.

Hansson, A. C., Crump, R. E., Graser, H. U., Sokolinski, R. (2005). Relationships among temperament and production traits of pigs. *Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics Vol. 16*: 141-144.

Hart, K., Contou, C., Blackberry, M., Blache, D. (2009). Merino ewes divergently selected for calm temperament have a greater concentration of immunoglobulin g in their colostrum than nervous ewes. *Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics.*

Hemsworth, P., Barnett, J. (2000). Human–animal interactions and animal stress. *The Biology of Animal Stress*: 309-315.

Henry, B. A., Blache, D., Rao, A., Clarke, I. J., Maloney, S. K. (2010). Disparate effects of feeding on core body and adipose tissue temperatures in animals selectively bred for Nervous or Calm temperament. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 299*(3): 907-917.

Herrmann, E., Hare, B., Cissewski, J., Tomasello, M. (2011). A comparison of temperament in nonhuman apes and human infants. *Developmental Science*, *14*(6): 1393-1405.

Keer-Keer, S., Hughes, B. O., Hocking, P. M., Jones, R. B. (1996). Behavioural comparison of layer and broiler fowl: measuring fear responses. *Applied Animal Behaviour Science*, *49*(4): 321-333.

Kilgour, R. J. (1998). Arena behaviour is a possible selection criterion for lamb-rearing ability; it can be measured in young rams and ewes. *Applied Animal Behaviour Science 57*(1–2): 81-89.

Kilgour, R. J., Szantar-Coddington, M. R. (1997). The arena test and cortisol response of sheep as indirect selection criteria for the improvement of lamb survival. *Animal Reproduction Science 46*(1): 97-108.

King, D. A., Schuehle Pfeiffer, C. E., Randel, R. D., Welsh Jr, T. H., Oliphint, R. A., Baird, B. E., Curley Jr, K. O., Vann, R. C., Hale, D. S., Savell, J. W. (2006). Influence of animal temperament and stress responsiveness on the carcass quality and beef tenderness of feedlot cattle. *Meat Science*, *74(3):* 546-556.

Kirschbaum, C., Hellhammer, D. H. (2000). Salivary cortisol. *Encyclopedia of stress Vol. 3*: 379-383.

Kulesskaya, N., Voikar, V. (2014). Assessment of mouse anxiety-like behaviour in the light-dark box and open-field arena: Role of equipment and procedure. *Physiology & Behavior 133*: 30-38.

Lansade, L., Bouissou, M. F., Erhard, H. W. (2008). Reactivity to isolation and association with conspecifics: A temperament trait stable across time and situations. *Applied Animal Behaviour Science 109*(2): 355-373.

Lansade, L., Bouissou, M. F., Erhard, H. W. (2008). Fearfulness in horses: A temperament trait stable across time and situations. *Applied Animal Behaviour Science*, *115*(3): 182-200.

Le Neindre, P., Poindron, P., Trillat, G., Orgeur, P. (1993). Influence of breed on reactivity of sheep to humans. *Genetics Selection Evolution 25*(5): 447 - 458.

Lee, T. K., Lee, C., Bischof, R., Lambert, G. W., Clarke, I. J., Henry, B. A. (2014). Stress-induced behavioral and metabolic adaptations lead to an obesity-prone phenotype in ewes with elevated cortisol responses. *Psychoneuroendocrinology 47*: 166-177.

Ligout, S., Foulquié, D., Sèbe, F., Bouix, J., Boissy, A. (2011). Assessment of sociability in farm animals: The use of arena test in lambs. *Applied Animal Behaviour Science 135*(1): 57-62.

Michelena, P., Sibbald, A. M., Erhard, H. W., McLeod, J. E. (2009). Effects of group size and personality on social foraging: the distribution of sheep across patches. *Behavioral Ecology 20*(1): 145-152.

Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C. G. (2007). Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior 92*(3): 317-339.

Morris, C., Cullen, N., Kilgour, R., Bremner, K. (1994). Some genetic factors affecting temperament in Bos taurus cattle. *New Zealand Journal of Agricultural Research 37*(2): 167-175.

Murayama, S., Sasaki, Y. (1987). Circadian variation in the blood cortisol level formed by feeding sheep. *Japanese Journal Of Zootechnical Science*: 333-340.

Murphy, P., Purvis, I., Lindsay, D., LeNeindre, P., Orgeur, P., Poindron, P. (1994). Measures of temperament are highly repeatable in Merino sheep and some are related to maternal behaviour. *Proceedings of the Australian Society of Animal Production 20*: 247-250.

Murray, T., Blache, D., Bencini, R. (2006). Calm dairy ewes produce more milk than nervous dairy ewes. *Australian Society of Animal Production 26th Biennial Conference, Comunicação 44*.

Nakayama, S., Johnstone, R. A., Manica, A. (2012). Temperament and hunger interact to determine the emergence of leaders in pairs of foraging fish. *PLOS One* 7(8): e43747.

Nowak, R., Poindron, P., Sèbe, F., Hart, K., Chadwick, A., Blache, D. (2006). Divergent selection on temperament affects vocal and locomotor activity in isolated newborn lambs. *Australian Society of Animal Production 26th Biennial Conference, Comunicação 45.*

Nowak, R., Porter, R.H., Blache, D., Dwyer, C. M. (2008). Behaviour and the Welfare of the Sheep. In: The Welfare of Sheep *Ed. C.M. Dwyer, Edinburgh, UK: Springer Science Business Media B.V.:* 81-134.

Pajor, F., Szentleleki, A., Laczo, E., Tozser, J., Poti, P. (2008). The effect of temperament on weight gain of Hungarian Merino, German Merino and German Blackhead lambs. *Archiv Fur Tierzucht - Archives of Animal Breeding 51*(3): 247.

Pajor, F., Muranyi, A., Szentleleki, A., Tozser, J., Poti, P. (2010). Effect of temperament of ewes on their maternal ability and their lambs' postweaning traits in Tsigai breed. *Archiv Fur Tierzucht - Archives of Animal Breeding 53*(4): 465-474.

Parraguez, V. H., Vergara, M., Riquelme, R., Raimann, R., Llanos, A. J., Serón-Ferré, M. (1989). Ontogeny of the circadian rhythm of cortisol in sheep. *Biology of Reproduction 40*(6): 1137-1143.

Réale, D., Gallant, B. Y., Leblanc, M., Festa-Bianchet, M. (2000). Consistency of temperament in bighorn ewes and correlates with behaviour and life history. *Animal Behaviour 60*(5): 589-597.

Scárdua, S. S., Bastos, R., Miranda, C. R. R. (2009). Temperamento em bubalinos: testes de mensuração. *Ciência Rural*, *39(2)*: 502-508.

Seaman, S. C., Davidson, H. P. B., & Waran, N. K. (2002). How reliable is temperament assessment in the domestic horse (*Equus caballus*)? *Applied Animal Behaviour Science, 78*(2): 175-191.

Sebastian, T., Watts, J., Stookey, J., Buchanan, F., Waldner, C. (2011). Temperament in beef cattle: Methods of measurement and their relationship to production. *Canadian Journal of Animal Science*, *91*(4): 557-565.

Silva, S., Almeida, J. C., Fontes, P. J., Castro, C., Machado, R., Azevedo, J. M. T. d. (2009). Comportamento de actividade e de vocalização de borregos em pré-desmame das raças Ile de France e Churra da Terra Quente num teste individual de interacção homem-animal. *CECAV-Centro de Ciência Animal e Veterinária.*

Silveira, I. D. B. (2005). Influência de genética bovina na susceptibilidade ao estresse durante o manejo e seus efeitos na qualidade da carne. *Universidade Federal de Pelotas - Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel.*

Silveira, I. D. B., Fischer, V., Mendonça, G. d. (2010). Efeito do genótipo e da idade de ovinos na reatividade medida em pista de venda. *Revista Brasileira de Zootecnia 39*: 2304-2309.

Simonetta, G., Walker, D. W., McMillen, I. C. (1991). Effect of feeding on the diurnal rhythm of plasma cortisol and adrenocorticotrophic hormone concentrations in the pregnant ewe and sheep fetus. *Experimental Physiology 76*(2): 219-229.

Starling, J. M. C., Silva, R. G. d., Negrão, J. A., Maia, A. S. C., Bueno, A. R. (2005). Variação estacional dos hormônios tireoideanos e do cortisol em ovinos em ambiente tropical. *Revista Brasileira de Zootecnia 34*: 2064-2073.

Vandenheede, M., Bouissou, M.-F., Picard, M. (1998). Interpretation of behavioural reactions of sheep towards fear-eliciting situations. *Applied Animal Behaviour Science 58*(3): 293-310.

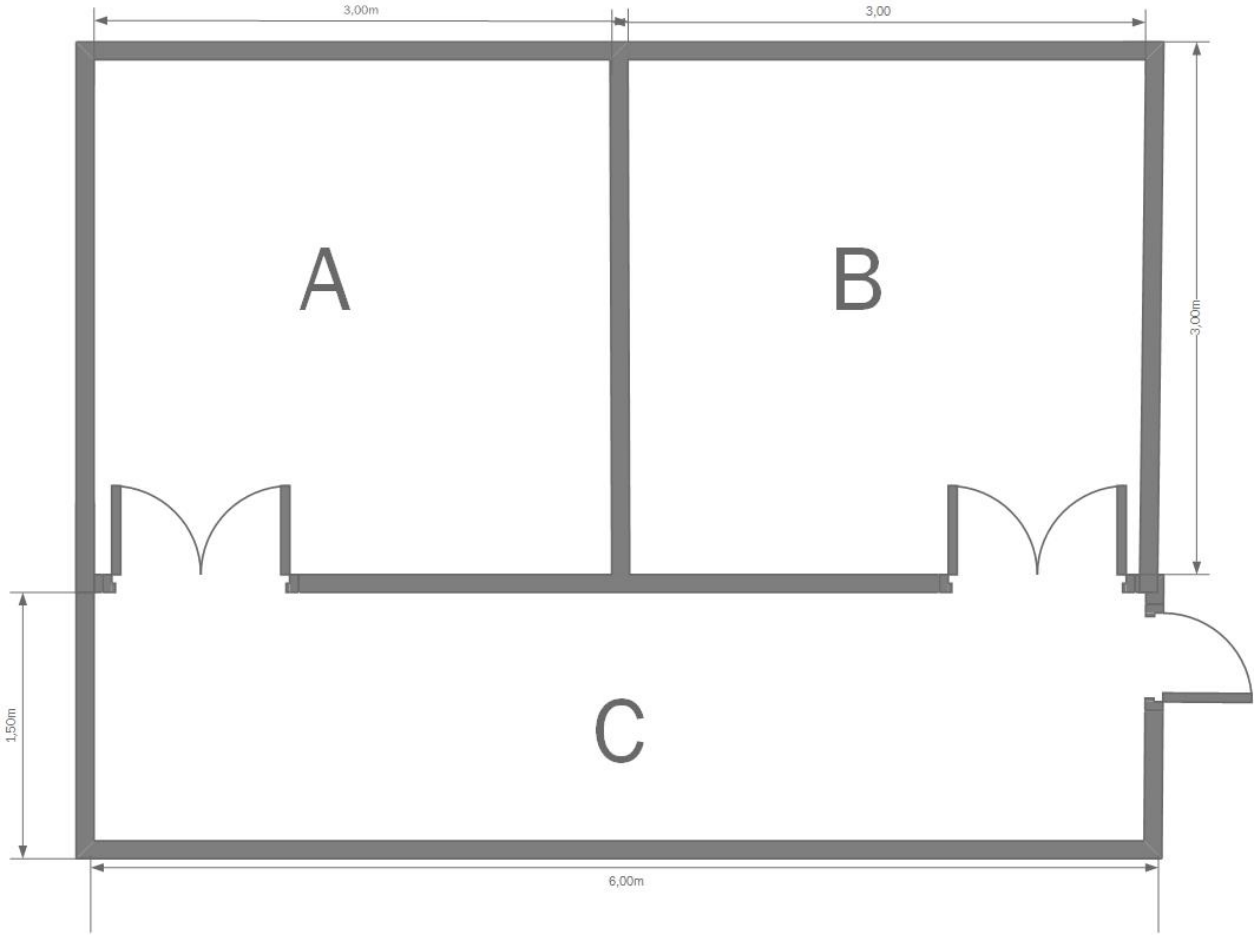
Villalba, J. J., Manteca, X., & Provenza, F. D. (2009). Relationship between reluctance to eat novel foods and open-field behavior in sheep. *Physiology & Behavior*, *96*(2): 276-281.

Voisinet, B., Grandin, T., Tatum, J., O'connor, S., Struthers, J. (1997). Feedlot cattle with calm temperaments have higher average daily gains than cattle with excitable temperaments. *Journal of Animal Science 75(4)*: 892-896.

Waiblinger, S., Boivin, X., Pedersen, V., Tosi, M.-V., Janczak, A. M., Visser, E. K., Jones, R. B. (2006). Assessing the human–animal relationship in farmed species: a critical review. *Applied Animal Behaviour Science 101*(3): 185-242.

Wolf, B. T., McBride, S. D., Lewis, R. M., Davies, M. H., Haresign, W. (2008). Estimates of the genetic parameters and repeatability of behavioural traits of sheep in an arena test. *Applied Animal Behaviour Science 112*(1): 68-80.

**Anexo A**




**Anexo A – Planta da área de alojamento de cada grupo (A e B) e arena de testes (C).**