

GIULIANO GUSTAVO LESNAU

**Correlação dos parâmetros endócrinos e comportamentais em
cadelas abandonadas em programa de ressocialização**

**São Paulo
2014**

GIULIANO GUSTAVO LESNAU

**Correlação dos parâmetros endócrinos e comportamentais em
cadela abandonadas em programa de ressocialização**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T 2944
FMVZ

Lesnau, Giuliano Gustavo
Correlação dos parâmetros endócrinos e comportamentais em cadelas abandonadas em
programa de ressocialização / Giuliano Gustavo Lesnau. -- 2014.
94 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2014.


Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

1. Cadelas. 2. Cortisol. 3. IL6. 4. Comportamento. 5. Estresse. I. Título.

Parecer do Comitê de Ética

	UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA		
<i>Comissão de Ética no uso de animais</i>		
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que o Projeto intitulado "Correlação dos parâmetros endócrinos e comportamentais em cães abandonados em programa de ressocialização", protocolado sob o nº 2273/2011, utilizando 30 (trinta) cães, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.</p>		
<p>We certify that the Research "Correlation of endocrine parameters and behavior in abandoned dogs in resocialization program", protocol number 2273/2011, utilizing 30 (thirty) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.</p>		
São Paulo, 18 de agosto de 2011.		
		
Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni Presidente		
Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87 Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" São Paulo/SP - Brasil	Fone: + 55 11 3091-7671/7672 Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7751 E-mail: fmvz@uesp.br	

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: LESNAU, Giuliano Gustavo

Título: Correlação dos parâmetros endócrinos e comportamentais em cadelas abandonadas em programa de ressocialização

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico todo este trabalho à minha família, que bravamente enfrentaram quatro anos de minha ausência, deram apoio, incentivo, não deixaram desistir, brigaram pela realização deste sonho.

À minha esposa **Marcilene C. S. Lesnau**, que passou por cima das dificuldades de cuidar do **Artur Felipe, Mariana Silva e Rafael de Luca** sozinha.

A estas três crianças especiais que amo demais, e aguardavam todo dia pela chegada do papai. Ah! Enfim podem dizer: o papai chegou!

Sem vocês, este projeto não chegaria ao fim.

Amo vocês.

Agradecimento especial

À minha orientadora, **Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa** que pacientemente usou diversas formas de ensino para me conduzir no caminho da pesquisa, soube pegar uma pedra bruta e começar a lapidar, deixando-me consciente de que a pesquisa é um constante aprendizado.

Agradeço pela amizade estabelecida, pelo convite para trabalhar na mesma sala, onde foi o período em que mais cresci. Agradeço pelo entusiasmo com que abraçou a causa do Bem Estar Animal de forma científica, pelas dúvidas que me colocou, pelas respostas que questionou e principalmente por não ter desistido de mim...

Obrigado por me receber nesta orientação, mesmo sem me conhecer, apenas acreditando em meus sonhos.

Tens minha admiração, muito obrigado.

Agradecimentos

À DEUS, que no silêncio das madrugadas, permitiu-me conhecê-Lo, entendê-Lo e me ensinou a conversar com Ele. Volto para casa com minha fé descoberta e com uma experiência íntima muito forte estabelecendo esta aliança. Graças dou!

À minha mãe Otilia Wisniewski Lesnau pelas vezes em que cruzou o Brasil para socorrer minha família na minha ausência e o apoio que sempre ofereceu.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por proporcionar infraestrutura de qualidade para um desenvolvimento científico e profissional adequado.

À Universidade Federal de Alagoas pela autorização e liberação para execução deste projeto, mesmo em meio atribulado e com tantos empecilhos.

Ao programa de pós graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres por aceitarem desenvolver esta nova linha de pesquisa.

Ao prof. Dr. José Roberto Kfoury Jr por ter disponibilizado seu laboratório, imprescindível para a execução do experimento.

À Liza Margareth M. C. Sousa e Renata dos Santos Silva por terem ajudado com tremenda paciência, na confecção dos artigos, na interpretação dos dados, no tratamento estatístico, no apoio para minha manutenção em São Paulo.

Aos colegas Luciana Alves de Fátima, Vanessa Uemura da Fonseca, Valdir Pavanelo Jr., Juliana Ferrão, Antenor Bonfim, Gabriela Mendes pela amizade e sempre terem me acolhido, mesmo o projeto não tendo nada em comum.

Ao Centro de Controle de Zoonoses de Guarulhos que abriu completamente as portas para a execução deste projeto, especialmente aos veterinários Fernando e Eduardo, aos funcionários do canil que sempre respeitaram o critério científico deste projeto com os protocolos de manejo.

Ao aluno de Iniciação Científica do LEME, Arnaldo Shindi Maruyama que bravamente executou nosso projeto piloto, navegando muitas vezes às escuras e acertando por instinto... você tem um futuro promissor!

Ao Prof. Dr. Ricardo Augusto Dias pelas dicas, pelo convite para integrar e acompanhar as atividades de seu grupo. Pode ter certeza que não me senti sozinho neste trabalho nem esmoreci nos ideais graças ao convívio com seu grupo, especialmente com a Lígia, à qual só tenho a agradecer.

A todos os proprietários que me receberam em suas casas para acompanhar seus cães diariamente, muitas vezes madrugando em feriados, mas sempre com os braços abertos e uma palavra de otimismo e ansiedade em conhecer os resultados da pesquisa.

À FAPESP pelo financiamento de grande parte do nosso material de pesquisa.

Aos funcionários e amigos do Setor de Anatomia que sempre me receberam como um membro de casa.

A todos vocês, muito obrigado!

Epígrafe

“Dizem que a oportunidade é uma deusa que tem cabelo na testa, portanto você tem de apanhá-la quando ela vem de frente porque depois que ela passa, a única coisa a fazer é se lamentar”.

“Portanto, aproveite a oportunidade quando ela vem na sua direção porque depois não vale reclamar”.

Roberto Shinyashiki

RESUMO

LESNAU, G. G. **Correlação dos parâmetros endócrinos e comportamentais em cadelas abandonadas em programa de ressocialização**. [Correlation of endocrine and behavioral parameters in abandoned dogs during ressocialization program]. 2014. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O mecanismo do estresse já é conhecido e apresenta dois momentos: o estresse agudo que libera fatores termogênicos e inflamatórios mediados por Interleucina 6 (IL6) e o crônico que busca a supressão da reação inflamatória e é mediado pela presença de cortisol. Quando cães abandonados são alojados em abrigos, também passam por um momento de adaptação, entretanto não existe até o momento um programa de ressocialização destes cães instituído em nível governamental, visando o bem estar junto a seus novos donos. A intervenção da ressocialização neste momento, a correlação do comportamento de cães com parâmetros fisiológicos e endócrinos relativos ao estresse ainda não foram descritas, o que suscita a hipótese de que a mesma possa amenizar os impactos traumáticos do abandono. Foram utilizadas 27 cadelas divididas em 3 grupos: com donos, abandonadas não treinadas e abandonadas treinadas. As cadelas abandonadas e treinadas foram depois adotadas. O adestramento durou 15 min/dia por 21 dias. A avaliação comportamental (etograma e etoteste) foi realizada a cada 7 dias e a avaliação dos parâmetros fisiológicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, taxa de oxigenação sanguínea, pulsação) bem como a coleta de saliva, diariamente. Após a adoção, os grupos foram acompanhados por mais uma semana. Os dados foram analisados por ANOVA, após verificação da normalidade dos mesmos. A correlação entre os parâmetros foi analisada por meio do teste de correlação de Pearson. Os valores foram considerados diferentes para $p < 0,05$. O resultado mais surpreendente foi a manutenção da IL6 em níveis baixos após a cirurgia de castração nas cadelas treinadas, enquanto os outros dois grupos, submetidos à mesma cirurgia tiveram elevação significativa desta citocina. Os resultados do treinamento foram mais evidentes nos etogramas após a adoção: houve melhora da interação dos cães com a nova família, aumento das atitudes de brincadeira, e maior receptividade aos novos donos. O abanar de cauda como comportamento de comunicação apareceu

com frequência muito maior nas cadelas treinadas depois de adotadas. Cadelas não treinadas após a adoção manifestaram mais comportamento de ociosidade, desestímulo e depressão, reduzindo seu estado de alerta. Estes resultados sugerem que o evento do adestramento tranquiliza as cadelas no ambiente estressante do abrigo, melhora seus parâmetros fisiológicos, controla comportamentos de medo tornando-as mais aptas a se adaptarem melhor após a adoção. Não houve diferenças no cortisol entre os três grupos ($p > 0,05$). No entanto, a concentração de IL6 foi menor nos cães treinados em relação aos demais ($p < 0,05$). No que diz respeito ao etoteste, houve correlação negativa entre IL6, sociabilidade e treinabilidade em todos os grupos ($r = -0,48$ a $-0,72$; $p < 0,04$) e com temperamento somente nos cães abandonados ($r = -0,72$; $p = 0,02$). Após a adoção, observou-se correlação positiva entre o cortisol e treinabilidade no grupo de cães treinados ($r = 0,99$; $p < 0,0001$). O adestramento permitiu maior aprendizado e concentração e maior socialização dos cães após a adoção. O aumento de IL6 interfere negativamente nesta ressocialização. Sugerimos que o cortisol contribua para a treinabilidade e aumento de IL6 seja um indicativo de falta de bem-estar.

Palavras-chave: Cadelas. Cortisol. IL6. Comportamento. Estresse.

ABSTRACT

LESNAU, G. G. **Correlation of endocrine and behavioral parameters in abandoned dogs during ressocialization program.** [Correlação dos parâmetros endócrinos e comportamentais em cadelas abandonadas em programa de ressocialização]. 2014. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The mechanism of stress is already known and can be divided in two stages: acute stress, which releases thermogenic factors and inflammatory -mediated interleukin 6 (IL6) and chronic stress, which suppresses the inflammatory response and is mediated by the presence of cortisol. When stray dogs are housed in shelters, they undergo a period of adaptation; however, until now there is not a ressocialization program at the governmental level aiming to improve their welfare along with their new owners. The ressocialization program beginning when dogs arrive to the shelter and the correlation of dogs' behavior with physiological and endocrine parameters related to stress have not yet been described, which raises the hypothesis that it can decrease the traumatic impact of abandonment. Twenty seven healthy bitches were divided into 3 groups: with owners, abandoned not trained and abandoned trained. The trained and abandoned dogs were later adopted. The training lasted 15 min / day for 21 days. The behavioral assessment (ethogram and ethotest) was performed every 7 days and physiological parameters assessment (heart rate, respiratory rate, blood oxygenation rate, pulse) as well as saliva collection, daily. After the adoption, the bitches were evaluated for 7 additional days. Data were analyzed by ANOVA, after testing the results for normality. The correlation between parameters was analyzed using the Pearson correlation test. Values were considered different at $p < 0.05$. The most surprisingly result was the maintenance of low levels of IL6 in trained dogs after neutering, whereas the other two groups showed a significant increase of IL6. The consequences of training were evident in ethograms after adoption: there was an improvement of the interaction of dogs with the new family, attitudes of playing were more numerous, and dogs showed a greater receptivity to the new owners. The tail wagging, as communication behavior, appeared much more frequently in trained dogs after adoption. Abandoned dogs after adoption manifested more idleness, discouragement and depression behaviors and reduced alertness. These results suggest that the training reassures bitches in the stressful shelter

environment, improves their physiological parameters, controls fear behaviors making them more able to adapt to the new environment after adoption. There were no differences in cortisol among the groups ($p > 0.05$). However, IL-6 concentration was lower in trained than in abandoned or owned dogs ($p < 0.05$). Concerning the ethotest, there was a negative correlation between IL6, sociability and trainability in all groups ($r = -0.48$ to -0.72 ; $p < 0.04$) and only in relation to temper in abandoned dogs ($r = -0.72$; $p = 0.02$). Upon adoption, there was a positive correlation between cortisol and trainability in trained dogs ($r = 0.99$, $p < 0.0001$). Training allowed greater learning and concentration and greater socialization of dogs after adoption. The increase in IL6 seems to impair this re-socialization. We suggest that cortisol contributes to the trainability and increases of IL6 denote lack of welfare.

Keywords: Bitches. Cortisol. IL6. Behavior. Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo da cadeia do estresse agudo e crônico.....	23
Figure 2 - Saliva cortisol (A) and IL6 (B) profiles in owned and sheltered dogs.....	33
Figure 3 - Effect of time in cortisol (A) and IL6 (B) concentrations in owned and sheltered dogs.....	34
Figure 4 - Quantitative (A) and qualitative (B) ethograms of owned and sheltered dogs.....	35
Figure 5 - Concentrations of cortisol (A) and IL6 (B) in owned dogs, abandoned and trained dogs.....	47
Figure 6 - Comparative levels of cortisol (A) and IL6 (B) in abandoned and trained dogs, before and after adoption.....	48
Figure 7 - Comparative levels of cortisol (A) and IL6 (B) in owned, abandoned and trained dogs, before and after spay	48
Figure 8 - Ethotest scores for aggressiveness, sociability, trainability between owned, abandoned and trained dogs.....	49
Figure 9 - Comparative ethotest scores of abandoned and trained groups assessed before and after the adoption.....	50
Figura 10 - Apresentação do resumo do artigo na forma gráfica solicitada pela revista.....	56

Figura 11 - Níveis médios dos hormônios do estresse encontrado nos grupos com donos, abandonados, treinados, abandonados após adoção e treinados após a adoção.....	64
Figura 12 - Gráficos representativos do padrão comportamental de Medo entre os três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção.....	66
Figura 13 - Gráficos representativos do padrão comportamental de Tentativa de comunicação e interação com o enriquecimento animado entre os três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção.....	67
Figura 14 - Gráficos representativos do padrão comportamental de movimentos com a boca entre os três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção.....	69
Figura 15 - Gráficos representativos do padrão comportamental de Interação com o ambiente e o enriquecimento inanimado das cadelas dos três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção.....	71
Figura 16 - Gráficos representativos do padrão comportamental de Ansiedade entre os três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção.....	73
Figura 17 - Gráficos representativos do padrão comportamental da postura das cadelas dos três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção.....	74
Figura 18 - Gráficos representativos do padrão comportamental de Euforia e conforto percebido pelas cadelas dos três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

°C- graus Celsius

µg – micrograma

µl – microlitro

ACTH- hormônio adrenocorticotrófico

ANOVA – análise de variância

CCZ – Centro de controle de zoonoses

CV – Coeficiente de variação

dL - decilitro

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

IL6 – interleucina 6

pg - picograma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 O estresse	21
2.1 Os hormônios.....	23
2.2 Comportamento de cães	24
CAPÍTULO 1.....	26
Abstract.....	27
3 INTRODUCTION	28
3.1 Animals and Methods.....	30
3.1.1 Dogs.....	30
3.1.2 Sampling procedures: cortisol and IL6 determinations	30
3.1.3 Ethogram.....	31
3.1.4 Data processing and statistical analysis	31
3.2 Results	32
3.2.1 Saliva concentrations of cortisol and IL6.....	32
3.2.2 Behavioral parameters and their correlations with cortisol and IL6 data.....	33
3.3 Discussion.....	34
CAPÍTULO 2.....	38
More training, more learning: less inflammation.....	38
Abstract.....	39
4 INTRODUCTION	40
4.1 Material and methods.....	42
4.2 Results	45
4.3 Discussion.....	49
4.4 Conclusions.....	53
4.5 Acknowledgments.....	53
CAPÍTULO 3.....	55
“É possível combinar dados hormonais, comportamentais e fisiológicos para prever emoções em cães de abrigos?”	55
Resumo	55
5 INTRODUÇÃO.....	57
5.1 Procedimentos Experimentais.....	57
5.2 Resultados e discussão.....	63
5.3 Conclusões	79
6 CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES GERAIS.....	80
REFERÊNCIAS.....	81

1 INTRODUÇÃO

A forma ética de se destinar os cães abandonados é a adoção. Entretanto não há estudos que avaliem os parâmetros fisiológicos e endócrinos do cão neste processo de abandono - alojamento - adoção - readaptação na nova casa, a fim de estabelecer um protocolo de bem estar para os animais. Há necessidade de se reduzir o abandono e estimular a adoção de cães abandonados. Para isso, um programa de treinamento pode facilitar muito a adaptação do cão ao ambiente de abrigo e da sua nova casa, aumentando suas chances de ser adotado e aceito pela nova família, o que viria a diminuir ou mesmo impedir o re-abandono.

Este re-abandono muitas vezes ocorre por uma falta de comunicação entre o novo proprietário (guardião é o termo mais adequado para designar a responsabilidade de uma pessoa perante os animais de estimação que fazem parte de seu lar) e os cães. Enquanto que cães utilizam linguagem corporal para se comunicar, os humanos normalmente utilizam a verbal (GAUNET, 2010; PETAK, 2013). No entanto os cães fazem a leitura corporal de seus donos/guardiões e neste momento podem ocorrer comunicações ambíguas, levando a uma resposta de desentendimento de ambas as partes: intolerância, atitudes mal-educadas, manifestação de fuga e, na maioria das vezes, o desenvolvimento de estresse com alterações hormonais por parte do cão. Por parte do dono, intolerância aos comportamentos demonstrados e re-abandono (KAMINSKI et al., 2009).

Muitos trabalhos mensuram os níveis séricos ou salivares de cortisol em cães (VINCENT; MICHELL, 1992; BEERDA et al., 1996; HENNESSY et al., 1997; BEERDA et al., 1998; PALME et al., 2005), entretanto, nunca foi estabelecido um panorama geral dos sinais clínicos, endócrinos, fisiológicos e comportamentais do cão, durante esta fase pós-abandono de adaptação ao estresse. Mesmo a adoção é um evento estressante aos cães, pois muitas vezes nunca tiveram contato direto e/ou frequente com seres humanos.

Outro fator muito estudado atualmente é a Interleucina 6 (IL6), indicadora de estresse agudo que apresenta relação com o cortisol (KUNZ-EBRECHT et al., 2003).

A homeostase do organismo depende de ajustes fisiológicos, e a alteração destes pode sinalizar a situação de estresse, agudo ou crônico. O estado do estresse, após a liberação de cortisol ou IL6, faz com que a frequência cardíaca, a pulsação e a frequência respiratória se elevem, o tempo de preenchimento capilar diminua, as mucosas empalideçam, e em grau crônico, o animal altere seu comportamento (GALOSY; CLARKE; MITCHELL, 1979; HERD, 1991; HYDBRING-SANDBERG et al., 2004).

O estresse agudo é uma reação imediata e está relacionado à liberação de IL6, que por ser uma citocina da reação inflamatória, pode elevar a temperatura do cão (HEINRICH et al., 2003). O passo seguinte à liberação da IL6 é a liberação de cortisol, que funciona como um feedback negativo. Quando o estresse se prolonga, o cortisol se acumula e permanece no organismo, gerando o estresse crônico (PALME et al., 2005; AIRES, 2008). Por isso o cortisol é considerado um marcador de estresse crônico enquanto a IL6 é considerada indicador de estresse agudo, entretanto, de forma não específica (PALME et al., 2005). Os comportamentos decorrentes do estresse foram citados anteriormente (BEERDA et al., 1999a; STAFFORD et al., 2012): abanar a cauda, rosnar, pular sobre as pessoas, sentar, circular, mudar de direção com frequência, ficar em pé com cauda ereta (estado de alerta), micção para demarcação territorial, ofegar, bocejar, vocalizar.

Como estes comportamentos estão associados e foram relatados para situações de estresse, objetivamos: (1) avaliar os comportamentos e os hormônios presentes na saliva de cães em situações de estresse como o abandono recente e a castração, (2) correlacionar os dados dos etogramas (frequência de observação) com os valores encontrados para os hormônios ao longo do período de estudo, (3) avaliar os parâmetros fisiológicos para correlacioná-los aos hormônios e comportamento, (4) buscando caracterizar o estresse de maneira ampla.

Ao final deste trabalho, esperamos comprovar a eficácia dos programas de ressocialização para promoção do bem estar dos cães e dos novos donos e caracterizar o estado emocional dos cães para as situações testadas com vistas a contribuir e aprimorar formas de avaliação do estresse em cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O abandono de animais de companhia tem se tornado uma constante e infeliz realidade nos dias de hoje. Motivados ou não pelas leis que impedem a eutanásia dos animais, o fato é que os CCZ's (Centros de Controle de Zoonoses) tornaram-se abrigos públicos de animais. A partir do momento em que se tem uma saída em menor velocidade do que a entrada, o CCZ se torna um gargalo depositário, com cães que dificilmente serão adotados devido à idade, agressividade, aparência, porte físico, deficiências ou disposição. Este trabalho aborda este último item, disposição, e buscou treinar os cães para estarem dispostos, receptivos e conhecedores do linguajar esperado de seus novos donos.

As causas de abandono são muitas, entretanto, nos Estados Unidos, há a possibilidade de se destinar um cão à adoção em abrigos ao invés de abandonar simplesmente na rua, como é feito no Brasil. Trabalhos realizados para mapear estas causas, apontaram razões comuns à realidade nos Estados Unidos e na Sérvia, como sendo a agressão contra as pessoas, a outros animais, comportamento de fuga, destruição, desobediência, sujeira, latidos excessivos (SEGURSON; SERPELL; HART, 2005; VUCINIC et al., 2009).

No Brasil, apenas três estados até o momento definiram legislação específica oficial contra a eutanásia de animais: São Paulo, Rio Grande do Sul e Pernambuco (PAULO, 2008; SUL, 2009; PERNAMBUCO, 2010) e vários outros estão em discussão, respaldados por decisão do ministério público. Estas leis, que visam ser estendidas ao restante do país, protegem os cães e gatos capturados da eutanásia, porém deposita muitos animais nas instalações por longos períodos. Esta situação gera ônus e estresse. São duas as fases do estresse, o agudo e o crônico. Este estresse envolve hormônios e citocinas que podem culminar com alteração de um comportamento ou reação fisiológica.

Os abrigos nem sempre apresentam o mesmo padrão de manejo e sanidade, o que dificulta o estabelecimento do perfil de bem estar dos animais. Entende-se por bem estar o fato dos animais possuírem as seguintes cinco condições fundamentais: livres de fome e sede, livres do desconforto, livres de dor, ferimentos e doenças,

livres para expressar seu comportamento normal, livres de estresse, medo ou ansiedade (HØGÅSEN et al., 2013). Quanto a estes quesitos, o Centro de Controle de Zoonoses de Guarulhos apresentou as características de uma instituição preocupada com este Bem Estar dos cães alojados, contribuindo para nossa escolha ao desenvolver este projeto.

No Brasil, a própria pressão midiática e da população tem pressionado para que os abrigos se adequem a este perfil, apesar de ainda andar a passos lentos em certas regiões como centro-oeste, nordeste e norte do Brasil, pois os maiores avanços fiscalizadores e punitivos têm ocorrido nas regiões sul e sudeste.

2.1 O estresse

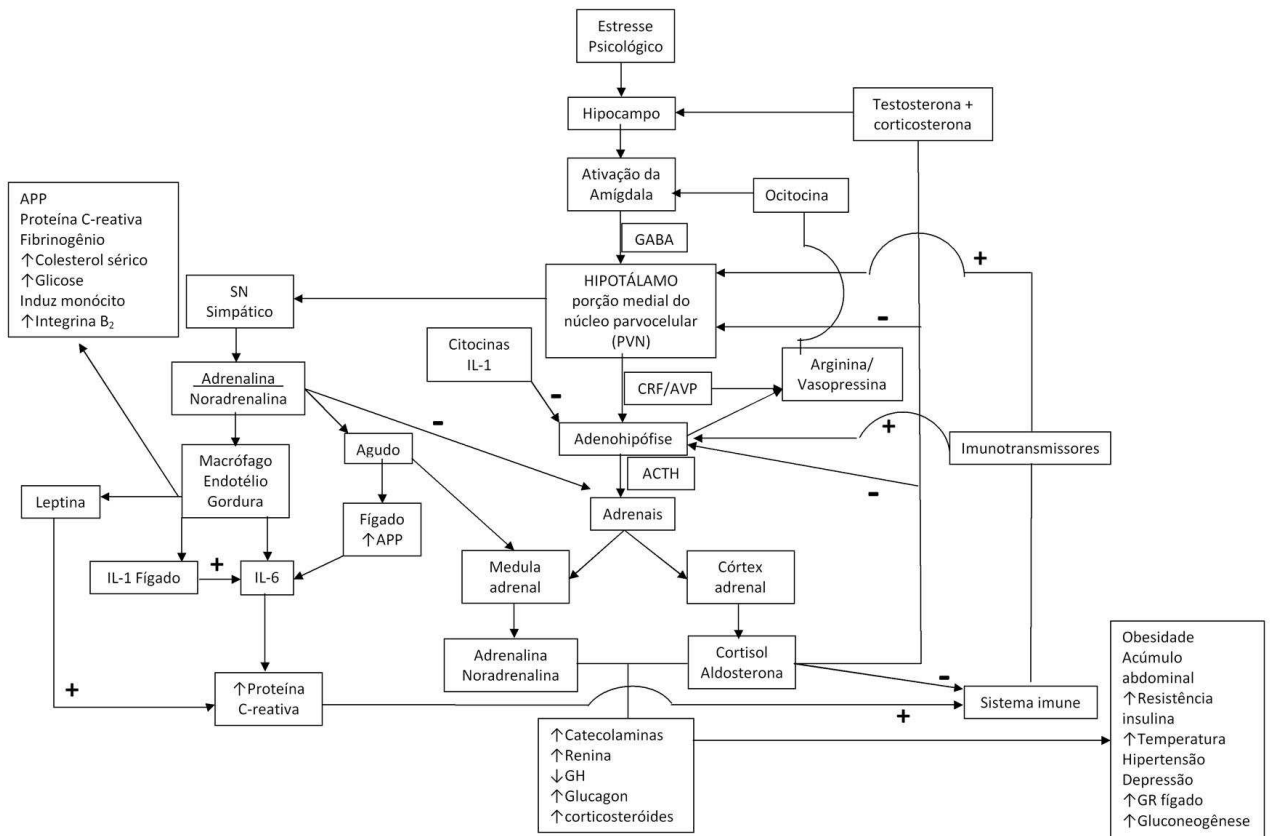
O estresse é um evento que se manifesta por ocasião da tentativa do corpo se adaptar a uma situação desconfortável. Para isso, o organismo lança mão de balanços hormonais, alterações comportamentais, ajustes fisiológicos, e podem ser desencadeados em um abrigo de cães por diversos fatores: captura, enjaulamento, manutenção em gaiolas, manejo, barulho, odores, presença de outros animais, disputas de territórios, presença de pessoas estranhas trabalhando ou visitando o canil, além do abandono propriamente dito.

O mecanismo do estresse e seus efeitos nos mamíferos já são conhecidos (AIRES, 2008), no entanto, a quantificação e determinação dos limites que tornam o estresse um distresse necessitam estudos. Enquanto o primeiro é uma reação normal, mesmo com seus picos e reações em cadeia, que consegue manter seu mecanismo de autorregulação, o segundo é um estresse prolongado, que foge à normalidade e traz prejuízos ao animal (SPARRENBERGER; DOS SANTOS; LIMA, 2003).

O estresse pode ser distinto em dois eixos: o nervoso e o humoral. O eixo nervoso está relacionado ao estresse agudo, enquanto que o humoral ao estresse

crônico. Ambos apresentam entre si, mecanismos de regulação. O hormônio final e de interesse no processo de estresse é o cortisol (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo da cadeia do estresse agudo e crônico



Fonte: (LESNAU, G.G., 2014).

O estresse faz parte da interação do indivíduo com o meio. Este desencadeamento leva ao aprendizado social dos cães (SHIER; OWINGS, 2007). Cães domésticos tornaram-se dependentes dos humanos com a domesticação, ao ponto de demonstrarem claramente sinais de apego aos seus proprietários (TOPÁL et al., 2005).

Hoje, a população canina desperta interesse nas questões de saúde pública, no que tange ao seu controle de crescimento, abandonos e índices de mordeduras (DUFFY; HSU; SERPELL, 2008). Cães abandonados podem ser reservatórios de patógenos, pois deixaram de receber cuidados sanitários e vacinações; ficam expostos a vetores de doenças, brigas por território e comida e diversos parceiros

sexuais. Assim, doenças como raiva, cinomose canina e leishmaniose se espalham em populações de cães e roedores coexistentes em uma mesma região (VANAK; GOMPPER, 2009; SHARMA et al., 2011). Como consequência, observa-se a redução da população canina por adoecimento e competição intraguilda (presa-predador-competidor) (VANAK; GOMPPER, 2009), além da exposição da população humana ao risco de contágio e mordidas (DUFFY; HSU; SERPELL, 2008), o que não está de acordo com preceitos de bem-estar animal e tentativas de melhoria das relações entre seres humanos e animais.

2.2 Os hormônios

O cortisol e as catecolaminas estão diretamente relacionados ao estresse, e são identificáveis pelo método de ELISA (CHAITANYA et al., 2013; SESAY et al., 2013). Como amostras, pode-se utilizar o sangue, a saliva e as fezes. A utilização de fezes para avaliar a situação estressante é útil para animais de vida livre, por não ser invasiva, mas apresenta um resumo de variabilidade do estado estressante em um longo período, ou seja, não é preciso o suficiente para determinar o momento exato da atividade estressante (PALME et al., 2005)

A adrenal do cão secreta quantidades significativas de cortisol e corticosterona, mas foi descrito que os níveis plasmáticos destes dois hormônios mostraram padrões similares de variações durante a separação e exposição ao novo (HENNESSY et al., 1997). Os níveis de cortisol de saliva e de sangue tem correlação estatisticamente significativa, dando a margem de 30 minutos para as respostas aparecerem na saliva (VINCENT; MICHELL, 1992).

É um desafio para a ciência conferir emoções aos animais, entretanto, os trabalhos com etologia, psicologia e bem estar animal, tem caminhado para esta conclusão. A gama de informações etológicas, clínicas, comportamentais e endócrinas acompanhadas simultaneamente foram nosso maior desafio, para discernirmos o momento no qual os sinais do estresse agudo se tornam sinais de

estresse crônico. Padrões isolados já estão definidos para alguns parâmetros, o que possibilitou comparações com nossas observações.

2.3 Comportamento de cães

A principal causa de abandono dos cães em outros países, segundo seus ex-proprietários foi a agressividade (TAKEUCHI et al., 2001; SEGURSON; HART; 2005). Estes animais que agrediam seus proprietários, na maioria das vezes sofriam de ansiedade de separação e tendiam a viver em apartamentos (TAKEUCHI et al., 2001), podendo ainda apresentar esse comportamento induzido por medo, possessividade, maternidade, atividade lúdica, predatória, excitação, dor e irritabilidade (LUESCHER; MEDLOCK, 2009). Entretanto, alguns dos animais em abrigos no Brasil foram resgatados após denúncias de maus tratos (PELEGRINO, 2013). O abrigo, na maioria das vezes preocupado com as cinco liberdades, provavelmente será mais agradável aos animais do que a situação em que viviam.

Comportamentos indesejáveis são difíceis de serem extintos, entretanto, há formas de se estabelecer barreiras para esse comportamento por meio do treinamento. A combinação de testes de realidade e punição se mostrou muito eficaz no processo de extinção comportamental na década de 50 do século passado (SOLOMON; KAMIN; WYNNE, 1953). Atualmente, sabe-se que os cães que observam uma atividade realizada com outro cão apresentam maior capacidade de aprendizado (ROONEY; BRADSHAW, 2013) e o reforço positivo quando bem aplicado, não apresenta diferenças entre fornecer petisco ou apenas um carinho (FUKUZAWA; HAYASHI, 2013).

A sociedade exige métodos humanitários para destinar os cães abandonados, frutos de superpopulação em decorrência de vários fatores (NORMANDO et al., 2009; VUCINIC et al., 2009). Em países em que a eutanásia já foi proibida, surge o problema de abrigar os animais por longos períodos (VOSLÁROVÁ; PASSANTINO,

2012). No Brasil, somente três estados, São Paulo, Rio Grande do Sul e Pernambuco, possuem leis específicas que proíbem e regulamentam a eutanásia de cães em abrigos públicos (PAULO, 2008; SUL, 2009; PERNAMBUCO, 2010), pois parte-se do princípio que os animais são conscientes e capazes de experimentar sensações negativas e emoções (BEKOFF, 2002; PAUL; HARDING; MENDEL, 2005).

Os abrigos para animais são ambientes altamente estressantes aos cães (COPPOLA; GRANDIN; ENNS, 2006), podendo causar traumas, comportamento agressivo e movimentos estereotipados, comuns em situações de estresse e abandono (HENNESSY et al., 1998). As cadelas são mais susceptíveis ao estresse ambiental (Garnier, Benoit, Virat, Ochoa, & Delatour, 1990), mas todo este impacto pode ser atenuado por meio da interação humana logo após a chegada (HENNESSY et al., 1998; COPPOLA; GRANDIN; ENNS, 2006). Programas de ressocialização, para formação especial (ambientar cães abrigados em programa de enriquecimento social para melhoria das características docilidade, obediência e sociabilidade) de cães com problemas comportamentais podem ajudar na readoção de cães de abrigo (NORMANDO et al., 2009).

As concentrações de cortisol no primeiro dia de abrigo são as maiores. Esse confinamento produz ativação prolongada do eixo hipotalâmico-hipófise-adrenal (HENNESSY et al., 1998) levando ao aumento da pressão cardiovascular, aumento do trabalho cardíaco sem aumento da atividade corporal e aumento da atividade vagal no coração (GALOSY; CLARKE; MITCHEL, 1979).

No terceiro dia de contato humano, os níveis de cortisol salivar já se encontram mais baixos (COPPOLA et al., 2006). O ato de acariciar somente, não reduz a resposta ao cortisol nos abrigos, mas as praticas de manejo em pet shops (pentear, acariciar, conversar com o cão, passear, secar, escovar) constituem meios eficazes de redução (HENNESSY et al., 1998).

Cães que não estejam sob estresse também podem apresentar comportamentos de estresse, porém, é o conjunto associado com os níveis hormonais que podem inferir no sentimento real dos animais.

Capítulo 1

Measurement of cortisol associated with IL6 improves understanding of dogs´ behavior in shelters

Giuliano Gustavo Lesnau¹, Arnaldo Shindi Maruyama¹, Renata Santos Silva¹, Liza Margareth Sousa¹, Paula Carvalho Papa¹

¹Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Correspondence should be addressed to Paula C Papa, Sector of Anatomy, Dept. of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques Paiva, 87 CEP 05508-270, São Paulo, Brazil; ppapa@usp.br

Abstract

This study aimed to evaluate the salivary concentrations of IL6 and cortisol in owned and sheltered dogs correlating these data to behavior parameters. For this study, dogs' behaviors were evaluated using a validated ethogram and saliva was collected for three consecutive days following visual and olfactory stimuli. The samples were processed by ELISA and results were statistically analyzed using GraphPad Prism 5.0 ($P < 0.05$). Data were correlated with behavioral parameters. IL6 levels in saliva of owned dogs were higher than those of sheltered dogs. Moreover, salivary cortisol tended to be higher in abandoned animals. Through the ethograms, only three behavior parameters presented significant differences between the two groups: changing posture, panting and walking. The correlations with behavior parameters and levels of IL6 and cortisol were positive between the parameter "walking" and the levels of salivary cortisol and negative with IL6. These results suggest that the owned dogs studied were more susceptible to increase of IL6 than sheltered dogs in face of unusual situations. We conclude that the association between behavioral evaluation through ethograms and measurement of salivary cortisol and IL6 are powerful indicatives of dog's welfare.

Keywords: Behavior. Dogs. Stress. IL6. Cortisol. Shelter.

3 INTRODUCTION

Although dogs have a highly social behavior (TUBER et al., 1996), every year, thousands of them are abandoned in Brazil. These dogs are often taken to public or Non-Governmental Organization (NGO) shelters. The involuntary separation between dog and human being causes behavioral and physiological reactions, even if it is for a short period (MINEKA; SUOMI, 1978; HENNESSY; RITCHEY, 1987). Exposure to a new environment is unpredictable for dogs since they lose control over environmental contingencies. Moreover, the change often results in increased production of cortisol (HENNESSY, 1986; HENNESSY et al., 1995; TUBER et al., 1996).

Current studies have reported that dog behavior was defined as belonging to four basic profiles: fearful, friendly, interested and aggressive (DOWLING-GUYER; MARDER; D'ARPINO, 2011). Animals under stress may present fearful moments showing behaviors, such as escaping, looking away, tail wagging, licking the lips, adopting a lower body posture, dropping the tail, trembling ears, producing vocalizations and salivation. The friendly behavior consists of playing, licking, standing, tail wagging, jumping and companionship. Aggressive dogs exhibit growling, teeth showing, bristly hair, tail bristling, rigid standing and biting. Barking in some situations is an aggressive component. The interested dog has been ranked as showing relaxed tail, forward ears, walking to approach a person (DOWLING-GUYER; MARDER; D'ARPINO, 2011).

Some individuals adapt to acute stressful stimuli, but when those stimuli are chronic, they may disrupt physiological changes (MCEWEN, 2007) that activate the stress system via the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, with the production of cortisol (MASON, 1975; TUBER et al., 1996; BEERDA et al., 1997). The maximum secretion of cortisol in animals occurs in the first hours of the day (BEERDA et al., 1999b). Abandoned dogs taken into shelters and confined show high plasma cortisol concentrations during the first three days of confinement in the new environment (HENNESSY et al., 1997; DOWLING-GUYER; MARDER; D'ARPINO, 2011).

Nevertheless, the acute stress initially activates the sympathetic nervous system (MASON, 1975; NGUYEN et al., 1998), responsible for promoting the release of IL6 (NGUYEN et al., 1998; BLACK, 2003), which increases the concentration of C-reactive protein, stimulating the immune system (MASON, 1975) and the release of cortisol. However, as the responses to acute and chronic stress are triggered from the hypothalamus, the maintenance of stress elevates cortisol levels to the point of immune suppression (MASON, 1975; VINCENT; MICHELL, 1992; BEERDA et al., 1998).

The evaluation of acute stress and behavior related to cytokines has not been performed in dogs yet (HENNESSY, 1986; STEPTOE et al., 2001; O'DONOVAN et al., 2010). Steptoe and colleagues (STEPTOE et al., 2001) described this relationship in humans, emphasizing the positive correlation between IL6 and behavior of acute mental stress. In dogs, researchers have addressed cortisol levels as indicative of acute stress and have therefore not found a correlation with behavior (BEERDA et al., 1998).

It has been suggested that stress is a normal adaptive body response, but when the trauma is long lasting and associated with neglect, there appear behavioral problems, which are commonly observed in sheltered dogs, making adoption rather unlikely. Among these behaviors, authors have described repetitive ones as compulsive self-licking. Activities such as vocalization and locomotion (walking, circling) were observed as being indicative of protest behaviors (TUBER et al., 1996). IL6 measurement can be a powerful tool to anticipate behavioral problems in shelter dogs. When accompanied by cortisol measurements (O'DONOVAN et al., 2010) and behavior observation it can be very helpful to shelter management (RITCHEY; HENNESSY, 1987; TUBER et al., 1996; MCEWEN, 2007).

Therefore, the aim of the present study was to investigate the relation between cortisol and IL6 salivary levels and the behavioral parameters in sheltered and owned dogs in order to add more comprehension to dog welfare.

3.1 Animals and Methods

3.1.1 Dogs

For this research, two groups of dogs were analyzed: group 1 (G1) consisted of 10 owned neutered dogs, and group 2 (G2) consisted of 10 neutered sheltered dogs, both male and female. Food was provided twice a day, whereas water was available *ad-libitum*. All the dogs were clinically healthy and received no medication. Experiments were approved by the Ethics Committee for the use of animals at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo (protocol number 2273/2011).

3.1.2 Sampling procedures: cortisol and IL6 determinations

Saliva samples were collected during three consecutive days in all sheltered (G2) and owned dogs (G1). Every day from 6 to 8 h, saliva was collected as previously described (OBAYASHI, 2013) and stored at - 20 °C until analysis. Cortisol and IL6 determinations were performed by immunoassay using the commercially available kits (Enzo® Cortisol EIA Assay Kit and Enzo® IL-6 EIA kit), Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA, USA, according to manufacturer's instructions. The cortisol kit produced reliable results for canine saliva (DRESCHER; GRANGER, 2009), whereas the accuracy of IL6 kit was checked, demonstrating parallelism between sample dilutions and the standard curve ($r = 0.99$ $P < 0.001$). All samples were run in duplicate. The intra-assay coefficients of variation (CV) for cortisol and

IL6 were 7.3% and 8.9%, respectively. The inter-assay coefficients were 7.89% and 8.82% for cortisol and IL6, respectively.

3.1.3 Ethogram

The ethogram was developed by using *ad-libitum* and *all-occurrence* sampling as previously described (ALTMANN, 1974; BEERDA et al., 1999b). Briefly, behavioral observations were conducted as follows: four observations per hour, one hour per dog (every 15 min; 5 min of observation and 10 min without observation), for 5 days/week, always in the morning (6 – 12h) (BEERDA et al., 1999b), from August 2010 to April 2011. The evaluated behaviors were self-licking, changing posture, environment recognition, yawning, sighing, stretching, vocalizations, playing, smelling panting, tail wagging, lying with head up, lying with head down, sitting and walking, which were recorded in terms of frequency of occurrence or in terms of the duration of occurrence (BEERDA et al., 1999b). There was no interference by the observer who could interfere with the normal behavior of dogs.

3.1.4 Data processing and statistical analysis

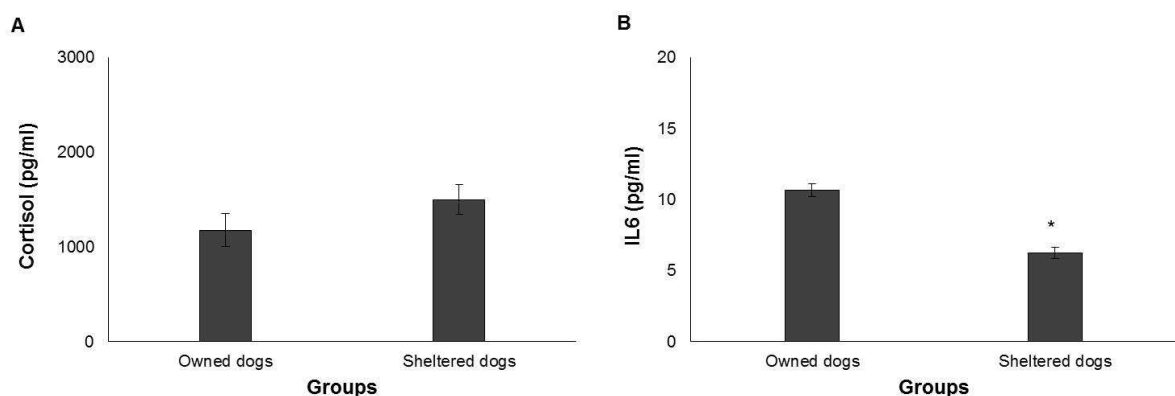
Multiple salivary cortisol measurements within 1 day were treated as separated values. Groups (owned and sheltered dogs) and the date of saliva collection (day) were treated as independent variables. Response variables were tested according to their homogeneity and normality of variances. Differences between owned and sheltered dogs were analysed by the Mann-Whitney test. Results are presented as mean \pm SEM. Pearson correlations were calculated for basal cortisol measurements against IL6 and behavioral parameters (ethogram). The level of significance was set at a $P < 0.05$. All calculations were performed using the GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

3.2 Results

3.2.1 Saliva concentrations of cortisol and IL6

In owned dogs, salivary concentrations of cortisol and IL6 were 1178.62 ± 170.29 and 10.67 ± 0.46 pg/ml, respectively. In sheltered dogs, cortisol and IL6 concentrations were 1470.31 ± 221.91 and 5.96 ± 0.46 pg/ml, respectively. There was a tendency to increased cortisol concentration in shelter compared to owned dogs ($P = 0.09$); however, IL6 concentration was lower in sheltered dogs compared to that in owned ones ($P = 0.007$; Figure1). Cortisol concentration decreased along the days of saliva collection in sheltered dogs ($P = 0.04$). In contrary, no difference could be observed in owned dogs, neither IL6 concentrations changed in both groups over the period of the study (Figure 2). Additionally, a negative correlation between cortisol and IL6 concentrations was observed in owned ($r = -0.84$; $P = 0.03$), but not in sheltered dogs ($r = 0.13$; $P = 0.70$).

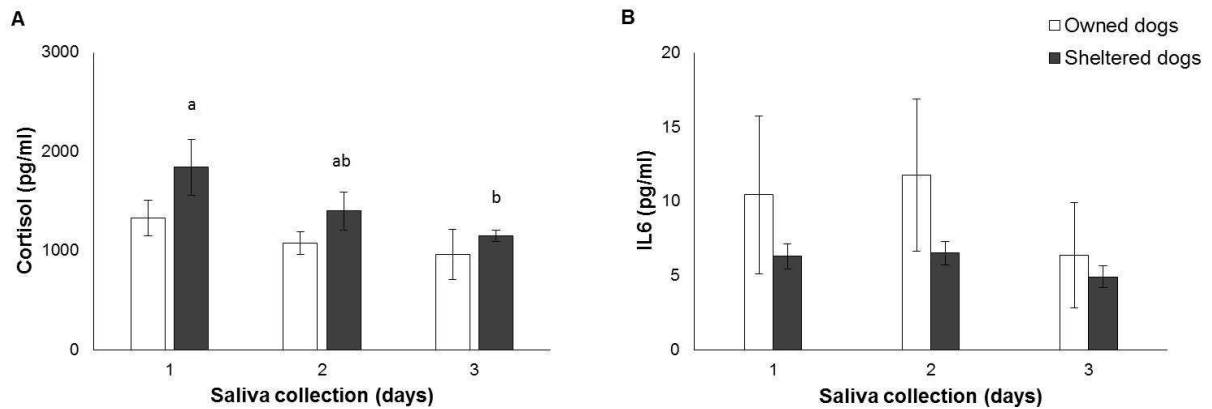
Figure 2 - Saliva cortisol (A) and IL6 (B) profiles in owned and sheltered dogs



Source: (LESNAU, G.G., 2014).

Legend: Saliva cortisol (pg/ml; A) and IL6 (pg/ml; B) profiles in owned and sheltered dogs determined by ELISA ($n = 20$; 10 animals per group). Data are presented as mean \pm S.E.M. Asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$).

Figure 3 - Effect of time in cortisol (A) and IL6 (B) concentrations in owned and sheltered dogs



Source: (LESNAU, G.G., 2014).

Legend: Effect of time (days of saliva collection) in cortisol (pg/ml; A) and IL6 (pg/ml; B) concentrations in owned and sheltered dogs (n = 20; 10 animals per group). Data are presented as mean \pm S.E.M. Different letters indicate a significant difference (P < 0.05).

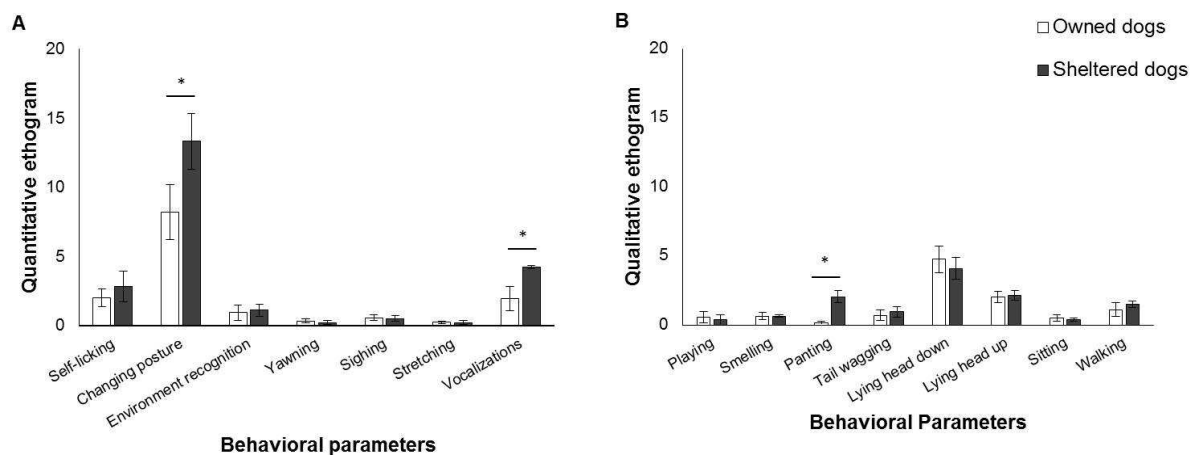
3.2.2 Behavioral parameters and their correlations with cortisol and IL6 data

Sheltered individuals showed increased changing of posture, panting, and decreased vocalizations in comparison to owned individuals (P = 0.02; Figure 3).

With regard to cortisol and IL6 determinations, in owned dogs, behavioral parameters, such as: self-licking, smelling and sitting were positively correlated with saliva cortisol concentrations ($r = 0.97$ P = 0.001; $r = 0.99$ P < 0.0001, and $r = 0.99$ P < 0.0001, respectively). In contrary, sighing, playing, panting and lying with head down were negatively correlated ($r = -0.89$ P = 0.01; $r = -0.83$ P = 0.04; $r = -0.89$ P = 0.01, and $r = -0.92$ P = 0.008; respectively). However, owned dogs IL6 was positively correlated with playing and lying with head down ($r = 0.99$ P < 0.0001 and $r = 0.98$ P = 0.0003; respectively), and negatively correlated with self-licking, yawning, stretching and sitting ($r = -0.94$ P = 0.004, $r = -0.85$ P = 0.03, $r = -0.85$ P = 0.03, $r = -0.90$ P = 0.01; respectively). In sheltered dogs, only playing was positively correlated

with cortisol ($r = 0.76$ $P = 0.01$), whereas tail wagging and vocalizations were negatively correlated with IL6 concentrations ($r = -0.69$ $P = 0.03$; $r = -0.72$ $P = 0.03$) and stretching showed positive IL6 correlation ($r = 0.66$ $p = 0.05$).

Figure 4 - Quantitative (A) and qualitative (B) ethograms of owned and sheltered dogs



Source: (LESNAU, G.G., 2014).

Legend: Quantitative (A) and qualitative (B) ethograms of owned (white bars) and sheltered dogs (black bars). Data are presented as mean \pm S.E.M. Asterisks indicate a significant difference ($P < 0.05$).

3.3 Discussion

Characterizing a dog undergoing a stressful situation may become a complex task. Different authors consider different cortisol values as stress indicators (EIGLER; SACCÀ; SHERWIN, 1979; HENNESSY et al., 1997; KOBELT et al., 2003; KUNZ-EBRECHT et al., 2003; STEPHEN; LEDGER, 2006; ACCORSI, 2008; HAVERBEKE et al., 2008; O'DONOVAN et al., 2010) and each study has analyzed a novel situation. Nevertheless, a combination between hormonal values and behavior may be complementary and helpful. The dogs of our study were typically dogs living in shelters (living with many other dogs without inanimate environmental enrichment) or homes (living alone with inanimate environmental enrichment during the time the owner goes to work). For thousand years, dogs, by living in the presence of humans,

have exceeded the limits of domesticity and become highly sociable beings in need of dynamic interactions with their environment, even for short periods (PULLEN; MERRILL; BRADSHAW, 2013). Many studies describe the ambient influence over dog behavior when environmental enrichment is animate or inanimate (BEBAK; BECK, 1993; BEERDA et al., 1998; WELLS; DEBORAH, 2004; DIESEL, 2011). Our results bring new insights about daily situations, in which owned dogs have access to inanimate objects, toys and activities in the absence of the owner, and sheltered dogs have access to other dogs and people due to the lack of resources for inanimate enrichment. The owned dogs of the present study presented discouragement, did not explore the ambience nor interacted with available inanimate enrichment. They spent most of time lying, not altered their position and were less panting. On the other hand, sheltered dogs were more active and presented constant interaction with other dogs. Correlations for owned dogs with cortisol were positive to 3 behaviors (self-licking, smelling, sitting), negative to 4 (sighing, playing, panting, lying with head down) and IL6 correlations were positive to 2 behaviors (playing, lying with head down) and negative to 4 (self-licking, yawning, stretching, sitting). To sheltered dogs, correlations of cortisol were positive only with playing, whereas IL6 was positively correlated with stretching and negatively to tail wagging and vocalizations, corroborating to another recent study (DALLA VILLA et al., 2013).

Cortisol salivary levels in owned dogs remained constant whereas in sheltered dogs decreased significantly over the collection period, pointing towards the capacity of dogs to adapt to stressful events, which has been described as psychobiological resilience (ASCHBACHER et al., 2013).

Salivary levels of IL6, normally secreted under acute stress situations (IZAWA et al., 2013b), were decreased and stable in sheltered compared to owned dogs. In shelters, dogs live in collective stalls and present a hierarchic and social behavior, which allows the maintenance of a balanced emotional state. The animate environmental enrichment was the base for the dogs' social organization and might have kept their lower IL6 levels. Though owned dogs had access to objects and toys as inanimate enrichment, IL6 levels were significantly higher. Another study focused

on the perception of dogs in face of inanimate enrichment (BOISSY et al., 2007), and concluded that they did not realize the objects and toys represented their interaction possibility with the ambient, since there was nobody to motivate or encourage them to play with.

Common sense about cortisol elevations as negative events or preventing dogs from undergoing stress may be partially incorrect since hormonal fluctuations can make dogs feel new environmental challenges (HAVERBEKE et al., 2008; ASCHBACHER et al., 2013; GOMES DA SILVA et al., 2013). Exaggerated hormonal elevations may lead to health problems, as low immune response, psychological and neurogenic disturbances as well as physiological and behavioral alterations (DE ALMEIDA et al., 2013). Higher basal cortisol levels may be considered normal and suitable, since its increase due to challenge exposure will occur. An unchallenged dog will present cortisol levels in a narrower range, leading to decreased resilience and higher probability of developing stress under low cortisol variations. This is one plausible explanation for indication of stress under low cortisol levels. Contrarily, IL6 should remain low to avoid emotional and systemic disturbances (MEYER; DA SILVA, 1999; CARROLL et al., 2011; DE ALMEIDA et al., 2013; GOMES DA SILVA et al., 2013). Sheltered dogs present behavior pattern similar to that of owned dogs, although interaction with the environment and other dogs were greater. Cortisol and IL6 ratios in shelters (high cortisol and low IL6) was more balanced than that in residences (low cortisol and high IL6), which was the opposite of what we had expected. Owned dogs presented twice as much the number of behaviors correlated with IL6 and seven fold more behaviors correlated with cortisol. Behaviors as self-licking, stretching and sitting were negatively correlated with IL6, which means that higher levels of IL6 reduced behavioral expression, characterizing a state of torpor and apathy. We would like to highlight that playing, which was positively correlated with cortisol in shelters, was negatively correlated in residences. Other studies (CHRISTENSEN et al., 2007; DALLA VILLA et al., 2013) report that playing does not occur among stressed dogs, which may be the case of the owned dogs observed in the present study. We can infer that dogs in that specific shelter presented necessary levels of cortisol to develop playing as an interaction and enrichment tool leading to a healthy resilient state (ASCHBACHER et al., 2013). Considering cortisol and IL6

levels in owned dogs in the present study, we suggest that owners should start teaching their dogs how to play in order to promote an enriched and challenging environment (ROONEY; BRANDSHAW; ROBINSON, 2001; APPLEBY; BRADSHAW; CASEY, 2002) and to keep the stress-related hormonal ratio resulting from cortical stimulation in balance (PAVLOVA; MATS; PONOMAREV, 2012). Low cortisol may lead to torpor, although a sudden increase of IL6 seems to increase cardiac frequency (HEINRICH et al., 2003). Since dogs are attracted by novelties, which is an advantage when new environmental enrichments are proposed (PULLEN; MERRILL; BRADSHAW, 2012), playing stimulation, for example, may prevent IL6 from increasing under unpredictable situations (BOISSY et al., 2007; GAUNET, 2010; PULLEN; MERRILL; BRADSHAW, 2012).

In summary, dogs need ambient enrichment to interact as a highly sociable being. The most effective possibility of enrichment is the animate one represented in our study by other dogs or people. Owned dogs living alone may profit more from interacting with their family. The fact that a dog is quiet, showing no typical behavior as self-licking, may be a sign of stress. Dogs analyzed in the shelter could overcome the stressful situation keeping their basal levels of cortisol a little higher. Elevations of salivary IL6 were always related to undesirable behavior and have helped to understand the correlation between behavior and stress in shelter and owned dogs.

3.4 Acknowledgements

Authors would like to thank Shelter “Todo Animal” in Pirassununga, São Paulo, Brazil and Dr. Adauri Brezolin for the English revision of the manuscript. This research was financially supported by FAPESP (grant 2011/22173-9).

Capítulo 2

More training, more learning: less inflammation

Giuliano Gustavo Lesnau^{a*}, Liza Margareth Medeiros de Carvalho Sousa^a, Paula de Carvalho Papa^a

^a Sector of Anatomy, Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

*Corresponding author

Sector of Anatomy, Dept. of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of São Paulo, Av. Prof. Dr. Orlando Marques Paiva, 87 CEP 05508-270, São Paulo, Brazil; Tel.: +55 11 3091 1433

E-mail address: lesnau@usp.br

Abstract

Our goal was to increase the success of adoptions of sheltered dogs, assessing the hormonal influence of IL6cortisol on the behavior and learning of animals. For this purpose, 27 dogs were used and divided into 3 groups: 1 – owned dogs (n = 9), 2 - abandoned dogs (n = 9) and 3 - trained dogs (n = 9). Animals from “abandoned” and “trained dogs” groups were subsequently adopted. An ethotest was conducted, every 7 days, for a period of 21 days (4 daily observations within 1 hour; every 15 min: observation of 5 min and interval of 10 min). Saliva was collected for cortisol and IL6 measurements by ELISA and these data were correlated with behavioral parameters: aggressiveness, sociability and trainability. Cortisol and IL6 concentrations were: 0.239 ± 0.04 mg / dl and 65.63 ± 16.13 pg / ml in owned dogs; 0.37 ± 0.09 mg / dl and 136.75 ± 67.9 pg / ml in abandoned dogs and 0.37 ± 0.07 mg / dl to 45.89 ± 9.13 pg / ml in trained dogs. There were no differences in cortisol levels among the groups ($P > 0.05$). However, IL6 concentration was lower in trained dogs in relation to the others ($P < 0.05$). After adoption, cortisol decreased only in abandoned dogs and IL6 decreased in both abandoned and trained dogs ($P < 0.01$). Trained dogs obtained the highest scores in all behavioral parameters when compared to owned dogs ($P < 0.05$), while abandoned animals received the lowest scores for trainability in relation to the others ($P < 0.0001$). After adoption, the scores of abandoned and trained groups increased compared to the time prior to adoption ($P < 0.05$). With regard to cortisol and IL6 determinations, there was a negative correlation between IL6, sociability and trainability in all groups ($r = -0.48$ to -0.72 ; $P < 0.04$) and with temperament only in abandoned dogs ($r = -0.72$, $p = 0.02$). After adoption, there was a positive correlation between cortisol and trainability in trained dogs ($r = 0.99$, $P < 0.0001$). Training allowed greater socialization of dogs after adoption accompanied by higher cortisol and lower IL6 levels. Animals with higher IL6 concentrations obtained the lowest ethotest scores and showed more difficulty of re-socialization in the new home.

Keywords: Ethotest. Cortisol. IL6. Re-socialization. Training.

4 INTRODUCTION

There is a great concern about the welfare of abandoned animals when they are housed in shelters. It is believed empirically that owned dogs live better than abandoned or sheltered ones. For good public health practices, free-roaming population should be controlled and resettled in new homes. Unfortunately, a good number of these animals is unsociable, and ends up escaping from or not interacting with the new family (BENNETT; ROHLF, 2007). Studies in which these dogs were trained obtained good results related to behavioral control; however, the methodology used was expensive and time-consuming (LUESCHER; TYSON MEDLOCK, 2009; ARHANT et al., 2010; BRAEM; MILLS, 2010; POULSEN; LISLE; PHILLIPS, 2010). The intention to train dogs in shelters is to increase their adoptability, broaden their form of communication with humans and avoid getaways and disobedience (LUESCHER; TYSON MEDLOCK, 2009; ARHANT et al., 2010; BRAEM; MILLS, 2010; POULSEN; LISLE; PHILLIPS, 2010). However, few studies have specifically focused on how they would be behaving after abandonment in a time-related manner (ODENDAAL; MEINTJES, 2003; SINISCALCHI et al., 2013; STARLING et al., 2013).

Stress is conceptualized in eustress, which is the healthy stress, when hormone levels fluctuate within an acceptable organic limit for interaction with the environment, and in distress, which is the bad stress, when hormone levels exceed the organic limits, generating undesirable consequences in many organs (ACCO; PACHALY; BACILA, 1999; BEERDA et al., 1999b; MEYER; DA SILVA, 1999; SCHOMMER; HELLHAMMER; KIRSCHBAUM, 2003; PALME et al., 2005; DIESEL, 2011; ASCHBACHER et al., 2013).

Re-socialization, change of life or environment, causes stress that might be acute when it is rapidly overcome, or chronic, when this stimulus becomes unpleasant for a long time (HENNESSY; MORRIS; LINDEN, 2006). Two factors are related to stress: interleukin 6 (IL6) to acute stress (HEINRICH et al., 2003; KUNZ-EBRECHT et al., 2003; CARROLL et al., 2011; CAMPISI et al., 2012; IZAWA et al.,

2013b), and cortisol to chronic stress (BEERDA et al., 1997; BEERDA et al., 1999b; BEERDA et al., 2000; ACCORSI, 2008; AGUILERA, 2011). It has been reported that cortisol influences learning in dogs under stress (HAUBENHOFER; KIRCHENGAST, 2007; HAVERBEKE et al., 2008). IL6 participates in the first general inflammatory response to any injury (BLACK, 2002), including psychic and immediate source as acute stress (HEINRICH et al., 2003; NAS et al., 2011; IZAWA et al., 2013a), and can interfere with cognitive performance, since it stimulates aggression when acting in the limbic system and amygdala (ARHANT et al., 2010; CARROLL et al., 2011; DE ALMEIDA et al., 2013).

Several studies on training have signaled that a good methodology to promote adoption should be cheap, feasible, efficient and would provide the well-being of dogs (TAKEUCHI et al., 2001; ARHANT et al., 2010; POULSEN; LISLE; PHILLIPS, 2010; FUKUZAWA; HAYASHI, 2013; STARLING et al., 2013). The ideal training should be short and daily (DE ALMEIDA et al., 2013; GOMES DA SILVA et al., 2013), via positive reinforcement, such as affection and praise (FUKUZAWA; HAYASHI, 2013), with direct contact between the trainer and dogs (HAUBENHOFER; KIRCHENGAST, 2007; KAMINSKI et al., 2009) in order to create an affiliated link of communication (GÁCSI et al., 2001; CALL et al., 2003; ODENDAAL; MEINTJES, 2003), facilitating, then, behavioral changes (YAMAMOTO; KIKUSUI; OHTA, 2009; BRAEM; MILLS, 2010).

However, we should question if these newly housed animals are not even more stressed during training. After all, it is a new activity that is being added to the stress of arrival at the shelter, considered a highly stressful place (DIESEL, 2011).

The most stressful events for abandoned dogs are capture and transport (BERGERON et al., 2002). Arriving at the shelter, the presence of other dogs, different sounds and smells, territorial disputes and facilities maintain the high level of stress (DEVRIES; GLASPER; DETILLION, 2003; CREEL, 2005; DALLA VILLA et al., 2013). The attitude of the first person who receives these dogs at the shelter is very important, as it will establish the first emotional bond and the dog will have just this reliable reference for its safety (HENNESSY; MORRIS; LINDEN, 2006; KAMINSKI et al., 2009; VICEDO, 2009). Training at this moment is described to avoid the dog's

dependency on this person and the development of fear and disobedience with future new owners (LUND; JØRGENSEN, 1999). Therefore, training in the very first day of arrival can be beneficial, because the dog will establish this link, will leave the stressful area, will perform an activity that reduces stress (GOMES DA SILVA et al., 2013), and will eventually associate these trainings to pleasant recreation (HAUBENHOFER; KIRCHENGAST, 2007).

Dogs undergoing training could manage stressful situations, and thus learn commands to interact and obey their owners or other person (BRAEM; MILLS, 2010). This learning can be measured by an ethotest (LUCIDI et al., 2005), which assesses three behavioral parameters: aggressiveness, sociability and trainability; the latter being a cognitive parameter for obedience to owners' commands.

Does training influence dogs 'behavior? Is there a stress-related hormonal profile matching trained, non-trained and owned dogs?

4.1 Material and methods

4.1.1 Animals

Twenty seven (27) crossbreed adult female dogs were evaluated into the respective groups: group 1 - owned dogs (n = 9); group 2 – abandoned dogs, housed at the animal shelter of Zoonosis Control Center (CCZ) in Guarulhos, São Paulo (n = 9); and, group 3 – trained dogs, also housed at the animal shelter of CCZ, but undergoing basic training (n = 9). Training was conducted in sections of 25 min in the morning for 21 days by the same male trainer (experimenter). It consisted of a relaxing free 5 minutes, which were discounted, with the dog on a leash in the external environment, to be able to smell, urinating and defecating. After this time, the trainer gave the following commands to the dog: together, here, sit, down and

stay. Commands were presented each other day, which require the dog to perform with success the first command before it could proceed to the next one.

Abandoned and trained animals were randomly chosen and housed in collective kennels with 9 individuals per lawn of 16 m², where they were protected from rain and had access to an open-air area at least once a day for 2 hours. Food was provided twice a day, whereas fresh water was available *ad-libitum*. The room temperature at the height of the dogs' body ranged from 19 to 22 °C. At day 14 of the beginning of data collection, all animals, including owned dogs, were spayed and declared healthy by veterinarians. Respectively, after 7 and 14 days of the surgery, abandoned and trained dogs were adopted, going to be called abandoned adopted and trained adopted dogs. After adoption, these animals were accompanied and data collection (saliva and behavioral parameters) was done for more 5 days. All experiments were approved by the Ethics Committee for the use of animals at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of São Paulo (protocol number 2273/2011).

4.1.2 Saliva sampling: cortisol and IL6 determinations

Saliva samples were collected in the morning, from 7 to 11h, for 28 days using a synthetic cotton for orthopedic use (3 x 5 cm) molded into a tubular shape. The dogs' manipulation was performed in less than 5 min to avoid interference in cortisol and IL6 levels (KOBELT et al., 2003). After centrifugation for 20 min, at 2236 x g and 13°C, saliva samples were stored at -20°C until analysis.

Cortisol and IL6 assessments were performed through immunoassay using the commercially available kits Salivary Cortisol (Salimetrics, State College, PA, USA; (DALLA VILLA et al., 2013) and IL6 human recombinant kit (Enzo Life Sciences, Plymouth, PA, USA; Lesnau et al., submitted), following the guidelines of manufacturers. All samples were run in duplicate. The low limit detection for cortisol and IL6 assays were 0.003 µg/dl and 14.4 pg/ml, respectively. The intra-assay

coefficient of variation (CV) for cortisol and IL6 were 8.57% and 2.86%, respectively. The inter-assay CV were 7.89% for cortisol, and 8.82% for IL6.

4.1.3 Ethotest

The ethotest was conducted as previously described (LUCIDI et al., 2005). Briefly, this instrument was composed by three steps, which were administered successively, forming a hierarchical algorithm of decision. The level of rigidity criteria was higher in the first step (aggressiveness and dominant temperament), medium in the second (initiative, sociability and fear) and lowest in the third (trainability). The first step, test A, focused on aggressiveness and dominant or non-dominant temperament, assessed the tendency to attack other dogs or humans and the tolerance to manipulations. The dogs were given a mark of either 0 or 1 for each parameter. This test requires the maximum punctuation (4), once any negative responses make the animal unsuitable for inclusion in intervention contexts. The second step, test B, comprises three parts: initiative, sociability and fearfulness. The dog's responses were assessed during 1 min, which was identical for all the dogs examined and for all the items. It requests a minimum of 11 points (maximum of 27). To avoid irregular profiles, it was stipulated a maximum typical deviation (dispersion measure frequently used) of 1 point. The third step, test C, comprises a series of evaluations which explored the dogs' aptitudes for training. The various items required tests of different lengths depending on the type of element examined; for example, the dog's response after a stimulus was evaluated within few seconds, but the walking trials took 15 min for the instructor to assign the right score. The cut-off value of 21 in a maximum of 50 and a maximum dispersion of 1.25 were stipulated. Ethotest was performed when the animals arrived at the shelter or on the first day of visit to owners and was repeated every 7 days until the last day of data collection. Each dog was judged independently, immediately after saliva collection, always by the same experimenter.

4.1.4 Statistical analysis

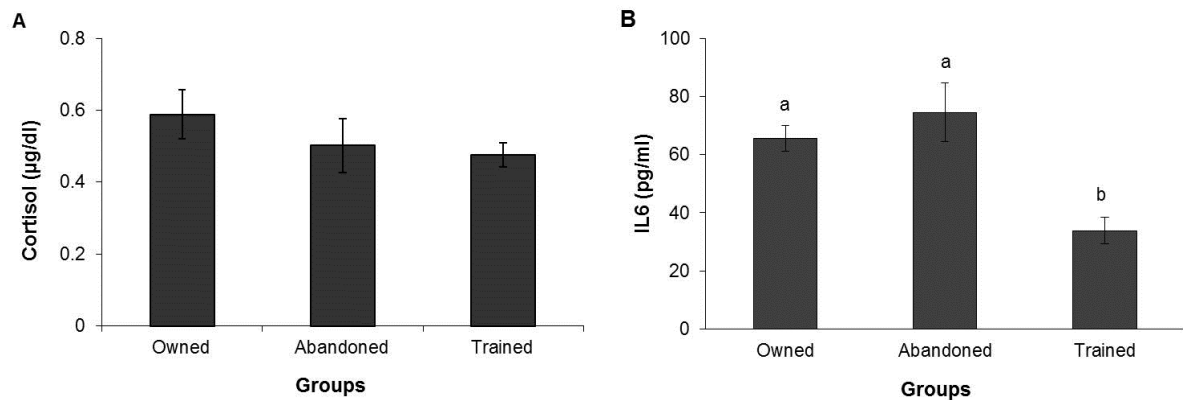
Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5 program for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Explanatory variables considered for inclusion in the statistical models were groups (owned, abandoned and trained dogs), training, adoption, spay and interactions. Dependent variables (i.e. cortisol and IL6 concentrations and behavioral parameters) were analyzed by repeated ANOVA or Mann-Whitney test measures when pertinent. Response variables were tested according to their homogeneity and normality of variances. Pearson correlations were calculated for cortisol measurements against IL6 and behavioral parameters (ethotest). Results are presented as mean \pm SEM. The level of significance was $P < 0.05$.

4.2 Results

4.2.1 Saliva concentrations of cortisol and IL6

Cortisol and IL6 concentrations were, respectively, 0.58 ± 0.06 $\mu\text{g/dl}$ and 65.5 ± 4.44 pg/ml in owned dogs, 0.50 ± 0.07 $\mu\text{g/dl}$ and 74.5 ± 10 pg/ml in abandoned dogs and 0.49 ± 0.03 $\mu\text{g/dl}$ and 37.05 ± 4.07 pg/ml in trained dogs. There was no difference among the groups ($P > 0.05$; Figure 5A). On the other hand, IL6 concentration was lower in trained dogs in relation to the other groups ($P < 0.05$; Figure 5B).

Figure 5 – Concentrations of cortisol (A) and IL6 (B) in owned, abandoned and trained dogs.

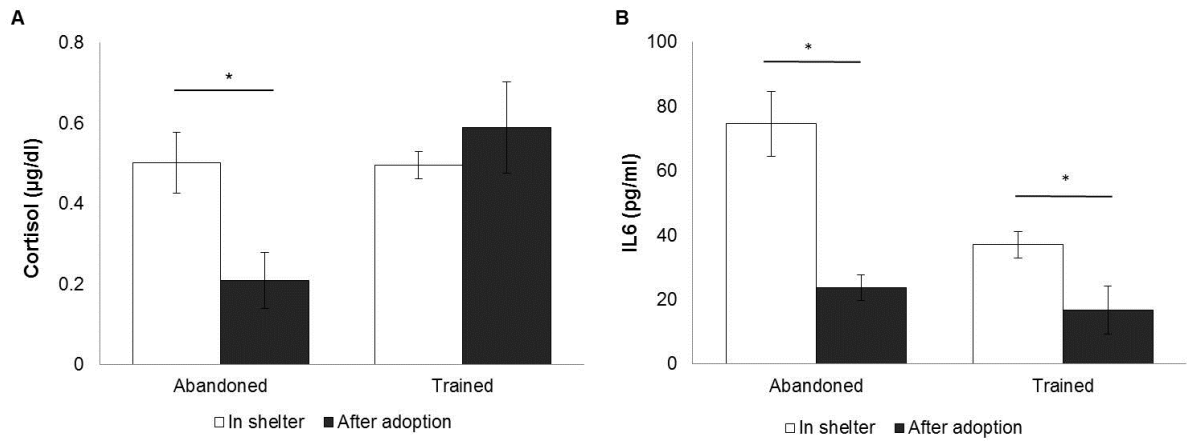


Source: (LESNAU, G.G., 2014).

Legend: Saliva cortisol (µg/dl; A) and IL6 (pg/ml; B) profiles in owned, abandoned and trained dogs determined by ELISA (n = 27; 9 animals per group). Data are presented as mean ± S.E.M. Different letters indicate a significant difference (P < 0.05).

Regarding training, there was no effect on cortisol and IL6 concentrations since the values were similar: 0.49 ± 0.03 before and 0.47 ± 0.03 after training for cortisol and 37.05 ± 4.07 before and 33.85 ± 4.64 after training for IL6. However, after adoption, cortisol levels decreased only in abandoned dogs, while IL6 decreased in both abandoned and trained dogs in relation to their respective controls (Figure 6). In addition, cortisol and IL6 concentrations increased in owned and abandoned dogs after spay (P < 0.05, Figure 7). No correlation was observed between cortisol and IL6 concentrations, except in trained adopted dogs ($r = 0.68$; P = 0.009).

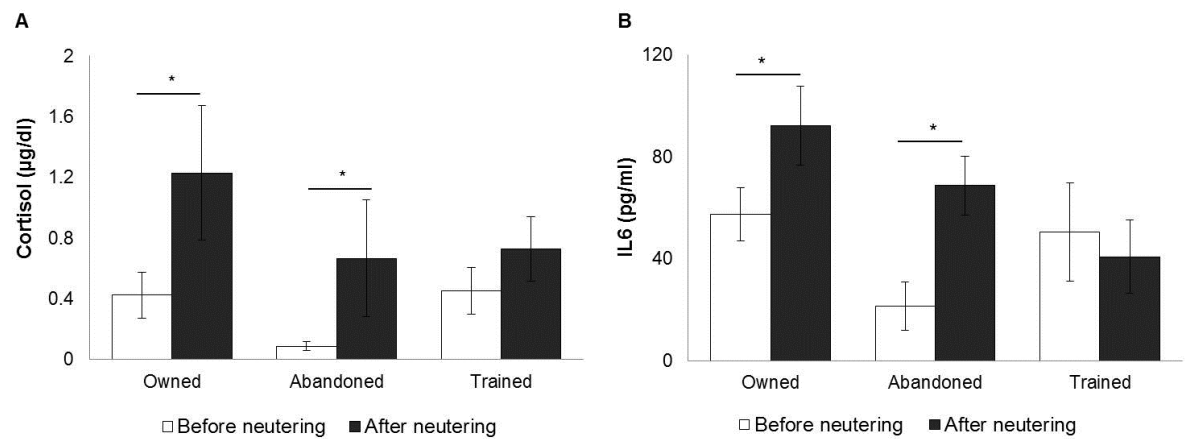
Figure 6 – Comparative levels of cortisol (A) and IL6 (B) in abandoned and trained dogs, before and after adoption



Source: (LESNAU, G.G., 2014).

Legend: Effect of adoption on cortisol ($\mu\text{g/dl}$; A) and IL6 (pg/ml ; B) concentrations in abandoned and trained dogs ($n = 18$; 9 animals per group). Data are presented as mean \pm S.E.M. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Figure 7 – Comparative levels of cortisol (A) and IL6 (B) in owned, abandoned and trained dogs before and after spay



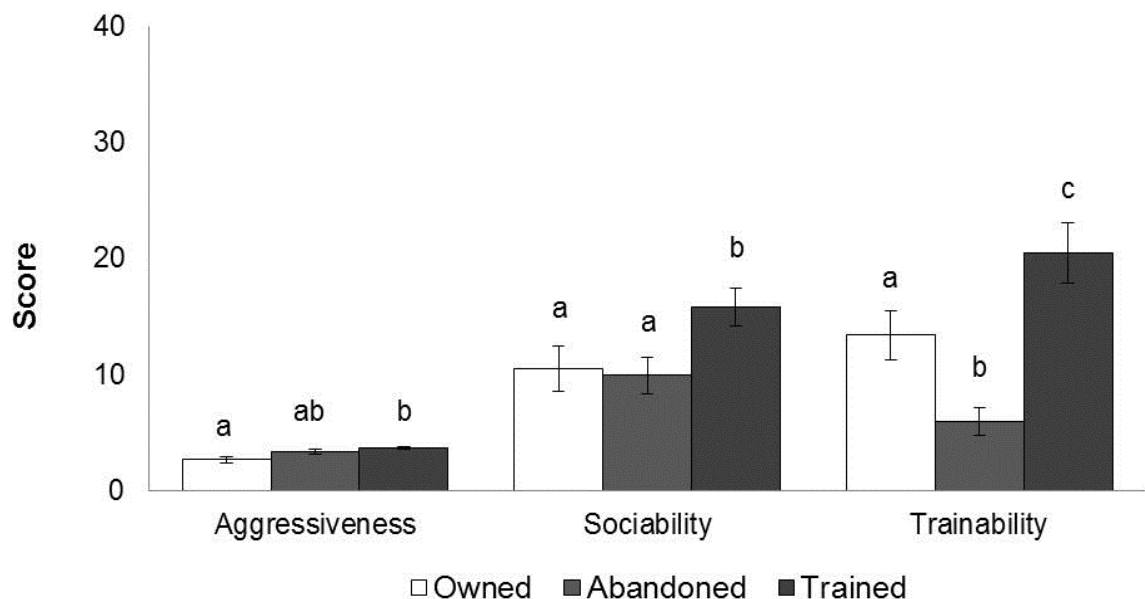
Source: (LESNAU, G.G., 2014).

Legend: Effect of spay on cortisol ($\mu\text{g/dl}$; A) and IL6 (pg/ml ; B) concentrations in owned, abandoned and trained dogs ($n = 27$; 9 animals per group). Data are presented as mean \pm S.E.M. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

4.2.2 Behavioral parameters and their correlations with cortisol and IL6 concentrations

Trained dogs obtained the highest scores for less aggressiveness, sociability and trainability compared to owned dogs group ($P < 0.05$). Abandoned animals obtained the lowest scores for trainability in relation to the other groups ($P < 0.0001$; Figure 8). After adoption, the score of sociability and trainability increased in all groups in relation to their respective control (Figure 9). Sociability and trainability were negatively correlated with IL6 in all groups investigated ($r = -0.48$ to -0.72 ; $P < 0.04$), and trainability only in abandoned dogs ($r = -0.72$; $P = 0.02$). After adoption, trainability was positively correlated with cortisol in trained dogs ($r = 0.99$; $P < 0.0001$).

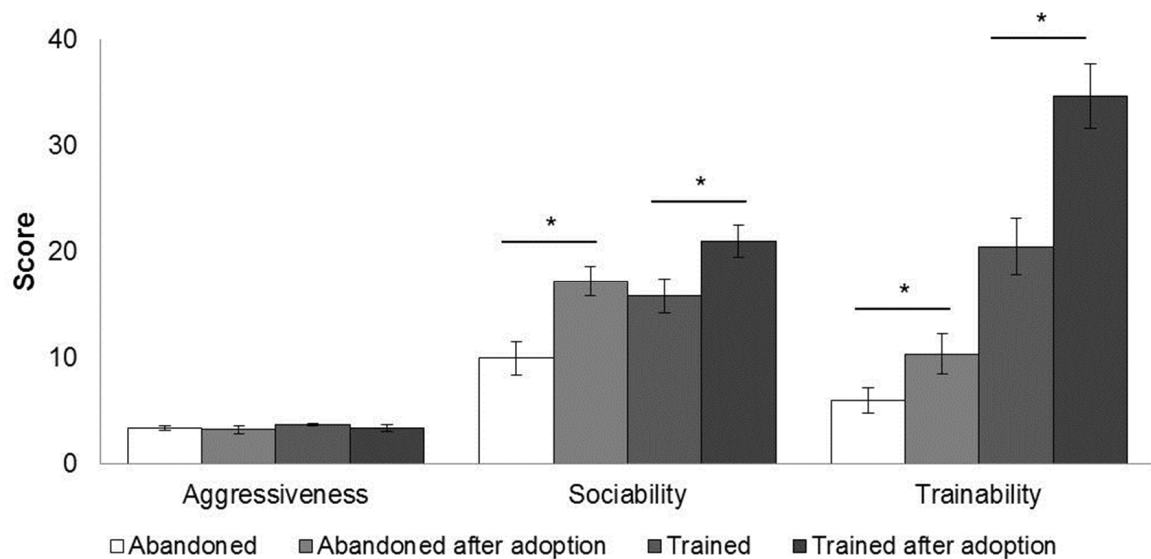
Figure 8 – Ethotest scores for aggressiveness, sociability and trainability between owned, abandoned and trained dogs



Source: (LESNAU, G.G., 2014).

Legend: Behavioral variations (aggressiveness, sociability and trainability) between owned, abandoned and trained dogs, determined by an ethotest. Data are presented as mean \pm S.E.M. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Figure 9 – Comparative ethotest scores of abandoned and trained dogs before and after adoption



Source: (LESNAU, G.G., 2014).

Legend: Effect of adoption on behavioral variations (aggressiveness, sociability and trainability) in abandoned and trained dogs, determined by an ethotest. Data are presented as mean \pm S.E.M. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

4.3 Discussion

According to our hypothesis, hormonal variation related to stress can influence dogs' trainability and behavior. Cortisol correlates positively, whereas IL6 correlates negatively with this trainability. Our suggestion of a re-socialization program was extremely beneficial to adapt the dogs from CCZ environment to new housing, once IL6 levels remained low throughout the experimental period.

Some environmental factors that affect the well-being were described as stressful: poor housing conditions, rigorous trainings and unpredictable social environments (BEERDA et al., 1997). Our training program (15 minutes per day over 28 days) was suitable for being brief, simple, economically viable (NORMANDO et al., 2009), accessible to anyone and to dogs and offered the possibility of re-socialization (LUESCHER; MEDLOCK, 2009). Re-socialization programs have been

established in other countries with great success, as it participates as a form of environmental enrichment (NORMANDO et al., 2009). The simple interaction with human beings is a way of improving the quality of life of sheltered dogs (LUCIDI et al., 2005; NORMANDO et al., 2009), which tend to form emotional bonds with people (GÁCSI et al., 2001; NORMANDO et al., 2009) after 3 days with daily 10-minute contact (GÁCSI et al., 2001). These animals thus increase their chances of adoption as they acquire confidence to moving up to the kennel door when a potential adopter comes to visit them (GÁCSI et al., 2001; WELLS; HEPPEL, 2001; NORMANDO et al., 2009).

Trained animals showed a positive correlation between trainability and cortisol levels. Considering that the levels of chronic stress were not achieved, i.e., cortisol levels did not achieve 0.9057-1.9927 mg/dl (HAVERBEKE et al., 2008), probably, this improved trainability should have occurred within the so-called eustress, which promotes a psychobiological resilience (ASCHBACHER et al., 2013). This resilience enables to the dog better withstand stresses, improving their learning to avoid a new uncomfortable situation (LUCIDI et al., 2005; HAVERBEKE et al., 2008; LUESCHER; MEDLOCK, 2009; NORMANDO et al., 2009). Cortisol levels did not decrease in trained adopted animals, and they behaved in a cheerful and curious way, encouraged to discover the new environment (BEERDA et al., 1997; APPLEBY; BRADSHAW; CASEY, 2002), which suggests that cortisol plays a role in preparing the dogs to adapt to new homes (SCHOMMER; HELLHAMMER; KIRSCHBAUM, 2003; HAVERBEKE et al., 2008; AGUILERA, 2011). The abandoned group, after adoption, presented decreased cortisol levels and an unsociable behavior with the new owners, which corroborates to the ability of cortisol to allow psychobiological resilience, as above (TUBER et al., 1996; SCHOMMER; HELLHAMMER; KIRSCHBAUM, 2003; POULSEN; LISLE; PHILLIPS, 2010; ASCHBACHER et al., 2013). Some authors (TUBER et al., 1996; HENNESSY et al., 1998; WELLS; HEPPEL, 2000b; a; HENNESSY et al., 2002; COPPOLA; GRANDIN; ENNS, 2006) have described that, during the contact between humans and sheltered dogs, the animals developed greater ability to adapt to the environment, reducing their cortisol levels (TUBER et al., 1996; SCHOMMER; HELLHAMMER; KIRSCHBAUM, 2003). In the present study, there was no decrease in cortisol levels after training; however, as

discussed above, cortisol levels that do not present a decrease can be indicative of successful trainability (HENNESSY; MORRIS; LINDEN, 2006), and can prevent the onset of acute stress (KUNZ-EBRECHT et al., 2003; IZAWA et al., 2013a). It is known that strenuous exercises elevate cortisol (NORMANDO et al., 2009), indicating that our training was not exaggerated, and also contributed to improving the dog's life quality.

Abandoned animals showed cortisol levels lower than those of trained adopted animals and concomitant no enthusiasm in interacting with the new environment. The maintenance of cortisol in highest physiological levels promotes a concomitant increase of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD11B) expression, which is an enzyme that reduces cortisone to the active cortisol, and prevents the binding of cortisol to the mineralocorticoid receptor, thereby directing this connection only for the specific glucocorticoid receptor (GR). The maintenance of this binding balance (cortisol - GR) allows the opening of calcium channels, and the mechanisms of learning and memory start to occur more effectively (AGUILERA, 2011). In humans, pathologically elevated or low cortisol levels can decrease the sensitivity to glucocorticoids and lead to depressive states (VAN ROSSUM et al., 2002). However, aggressiveness and sociability were not correlated with cortisol in either groups.

Spay can be considered a stressful, painful and invasive event for dogs (DEVITT; COX; HAILEY, 2005; SIRACUSA et al., 2010; HEKMAN; KARAS; DRESCHER, 2012), which was also observed in the present study for owned and abandoned dogs considering the increase in cortisol and IL6 levels. Surprisingly, trained dogs showed no elevated levels of cortisol and / or IL6 after spaying. These findings suggest that training kept standardized and higher cortisol levels (BEERDA et al., 1999b; NORMANDO et al., 2009; ASCHBACHER et al., 2013), probably resulting in an anti-inflammatory action and featuring an eustress as described previously (BROOM, 1988; ACCO; PACHALY; BACILA, 1999; KUNZ-EBRECHT et al., 2003; ASCHBACHER et al., 2013). The constancy of salivary IL6 levels in trained animals could also be explained by neuroendocrine mechanisms, which involved pro-inflammatory (IL6) and anti-inflammatory cytokines (IL10) (DE ALMEIDA et al., 2013; GOMES DA SILVA et al., 2013). Aerobic exercise performed daily in the morning

induces an increase of anti-inflammatory cytokines and reduces the pro-inflammatory ones, especially in the hippocampus and cerebellum (GOMES DA SILVA et al., 2013). However, low-intensity exercises promote beneficial effects, reducing IL6 and elevating anti-inflammatory cytokines (DE ALMEIDA et al., 2013). Our choice for a training routine showed to be effective as it was daily, low in intensity and affordable. In addition, the fact that IL6 values decreased only in trained dogs also corroborates to the ability of training to increase anti-inflammatory cytokines at the expense of the inflammatory ones (GOMES DA SILVA et al., 2013).

The negative correlation between IL6 and sociability in owned, abandoned dogs and abandoned adopted dogs demonstrates that these groups were less sociable than trained dogs, as observed (NAS et al., 2011). Studies conducted in humans, in whom people were trained with meditation, showed that IL6 has no correlation with mental preparation; however, this limit is very tenuous, causing confusion and misinterpretation when this training is not well implemented (PACE et al., 2010). The animals of the present study were carefully trained within the limits of time and physical effort. They interacted more, trusted more in people, were more docile and still had lower values of IL6; leading to similar observations of other authors (PACE et al., 2010; NAS et al., 2011; FITZGERALD; MACEY; BRECHT, 2012). The results of trained dogs are not consistent with those of the other groups, indicating that IL6 is related to anxiety (O'DONOVAN et al., 2010). Is there any relationship between IL6 and sociability? IL6 has been pointed out as a real indicator of acute stress (IZAWA et al., 2013b), and as a differentiator between shyness and stress. This stress is normal among dogs, not just in a fight dominance, but also in establishing hierarchy for joining the group. This makes them highly sociable in order to perform their activities in groups (CREEL, 2005). However, the highest levels of cortisol bind them into activity, which does not characterize a distress. The presence of elevated IL6 at this moment indicates the presence of distress, and it is independent of other cytokine (OHIRA et al., 2013). Individuals who have experienced childhood maltreatment will present higher IL6 levels and; subsequently, suffer more with acute stress (CARPENTER et al., 2010). Physical exercise, as performed by the trained group, improved animals' body condition and reduced the inevitable inflammation of spaying and the variation in IL6 circulating levels

(FITZGERALD; MACEY; BRECHT, 2012; HAMER et al., 2012), playing an important role in social reunification, human interaction with docility, and physical condition of the animals (NAS et al., 2011).

Although our cortisol and IL6 data do not behave inversely proportional as previously reported (KUNZ-EBRECHT et al., 2003), the results obtained for these parameters were able to lay the necessary groundwork for the behaviors observed and the scores obtained in the applied ethotest.

4.4 Conclusions

The highest physiological levels of cortisol are beneficial for adaptation to conditions under which training can adequately maintain these levels. While IL6 remains low, dogs develop more behaviors that are social and are more easily adapted to a new environment. Training and subsequent re-socialization of sheltered dogs depicted greater resilience in face of a surgical situation. We believe that the inclusion of training programs in shelters can greatly improve dogs' quality of life as well as their chances of adapting to the new residence. Finally, we suggest that measurements of cortisol and IL6 in saliva can be used as parameters for evaluating the adaptation of dogs to different environments, including the situation where they are used as experimental animals.

4.5 Acknowledgments

This research project was funded by FAPESP (grant n° 2011/22173-9). The authors wish to thank the Zoonosis Control Center in Guarulhos, the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo, the Federal University of Alagoas, and to Renata dos Santos Silva and Antenor Bonfim Neto for

their professional assistance during the study. The authors thank Dr. Aduari Brezolin for the English revision of the manuscript.

Capítulo 3

“É possível combinar dados hormonais, comportamentais e fisiológicos para prever emoções em cães de abrigos?”¹

Resumo

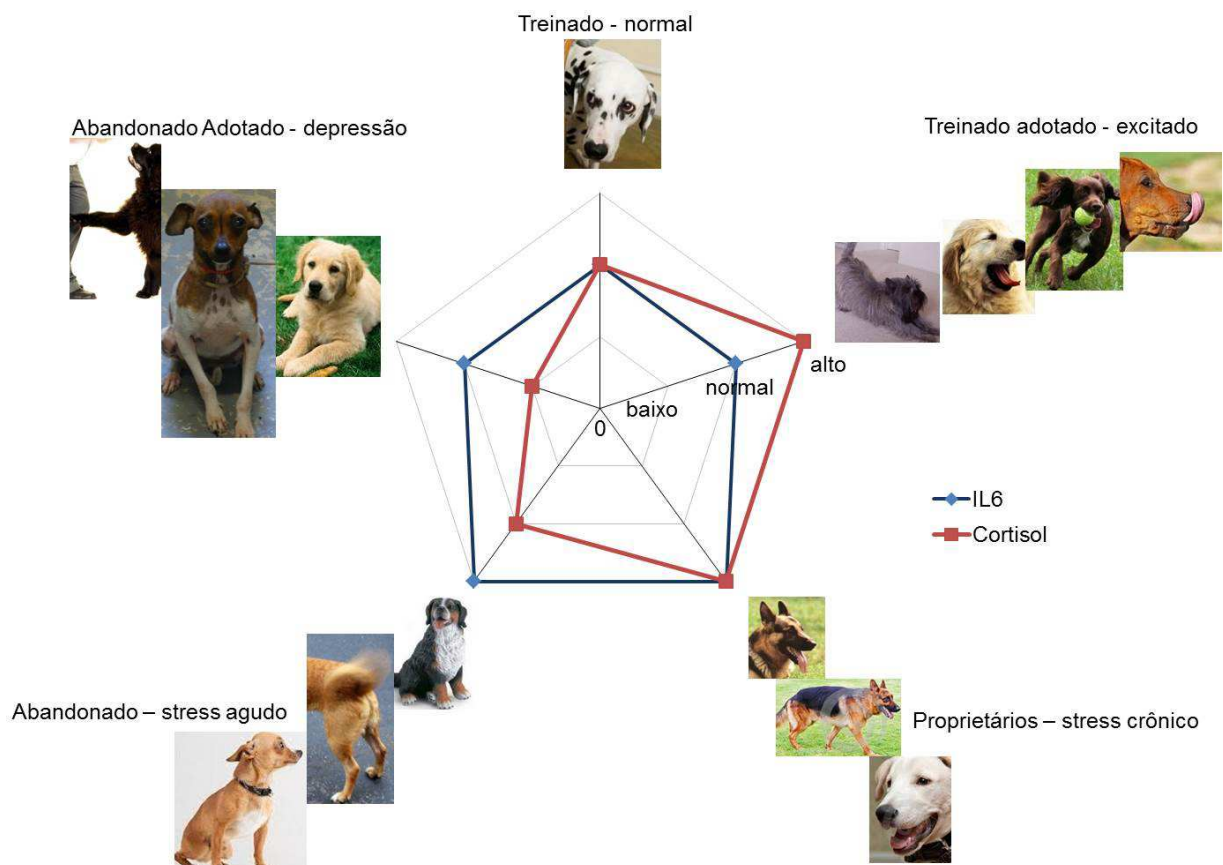
O bem estar animal está relacionado às condições necessárias para a manifestação de alegria dos animais. Nem sempre o que os seres humanos consideram como situação de conforto e bem estar, é percebido desta forma pelos cães. Qual seria a forma de identificar a satisfação destes cães? A análise suas emoções pode ser uma excelente alternativa. Neste trabalho buscamos as emoções expressas por cadelas de proprietários, abandonadas treinadas e abandonadas não treinadas, antes e após a adoção. Para definição emocional, utilizamos etogramas, cortisol, IL6, parâmetros fisiológicos e métodos estatísticos de correlação. Cinco emoções distintas foram identificadas (estados de depressão, estresse agudo, estresse crônico, normal e disposição), em situações ambientais idênticas quando comparadas as cadelas treinadas e não treinadas ou distintas, quando estes dois grupos eram comparados com cadelas de proprietários (Figura 10). Cadelas com padrão comportamental e hormonal normal foram as que receberam treinamento já no primeiro dia no abrigo, as cadelas com estresse agudo, foram as não treinadas que aguardaram a sua adoção no abrigo, as cadelas com estresse crônico foram as de proprietários mesmo nunca tendo sido abandonadas; as cadelas abandonadas depois de adotadas apresentaram depressão mas as treinadas adotadas foram as mais eufóricas e dispostas. Dentre as emoções já descritas para os animais, as

¹ Artigo em preparação para a revista **Current Biology**. Esta formatação é a apresentação da revista impressa, e neste capítulo a tradução ainda não foi realizada.

negativas foram as mais fáceis de serem detectadas, por apresentarem sinais discrepantes da normalidade. Concluímos que a abordagem holística realizada neste estudo foi capaz de mapear as emoções das cadelas e nos permitiu abordar as condições de bem estar de uma maneira global.

Palavras-chave: Comportamento. Emoções. Bem estar animal. Treinamento. Cães.

Figura 10 – Apresentação do resumo do artigo na forma gráfica solicitada pela revista



Fonte: (LESNAU, G.G., 2014).

Legenda: Resumo gráfico apresentado ao periódico *Current Biology*, destacando os cinco grupos de animais estudados (cães de proprietário, abandonados, treinados, abandonados adotados e treinados adotados), ilustrando os comportamentos característicos para a emoção demonstrada. Ao centro, gráfico em teia, indicando as variações (baixo, normal e alto) dos níveis de IL6 (azul) e cortisol (vermelho).

5 INTRODUÇÃO

A avaliação do bem estar animal está condicionada atualmente a uma concepção muito particular de cada avaliador, orientada pelos cinco graus de liberdade (HØGÅSEN et al., 2013). Existe uma tendência a inferirmos nossos sentimentos por empatia aos cães alojados em um abrigo, porém, nem sempre esta é a visão correta. Este trabalho avaliou diversos sinais comportamentais de comunicação dos cães, cruzando com dados humorais e parâmetros fisiológicos (frequência cardíaca, pulso arterial, taxa de oxigenação sanguínea e frequência respiratória), para caracterizar a condição de bem estar destes cães e a satisfação em determinadas condições. Por fim, elencamos cinco emoções gerais (depressão, estresse agudo, estresse crônico, estado normal e disposição).

5.1 Procedimentos Experimentais

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo 2273/2011), com autorizações por escrito e declaração de esclarecimento dos proprietários e convênio firmado com o Centro de Controle de Zoonoses de Guarulhos (CCZ) – SP.

Neste estudo foram avaliados três grupos de cadelas (com donos; n=9, abandonadas não treinadas; n=9 e abandonadas treinadas; n=9), recebendo água a vontade, ração duas vezes ao dia, dispondo de pelo menos 12m² de área livre individual (tanto nas casas quanto no abrigo – CCZ) e temperatura ambiental variando entre 19° e 22°C. As cadelas com donos nunca tinham sido abandonadas, foram castradas e passaram por momento de adaptação à presença do observador; as cadelas abandonadas foram acompanhadas desde o dia zero da sua chegada ao

abrigo, foram castradas, passaram pela adaptação à presença do observador, depois de 21 dias foram colocadas para adoção e foram acompanhadas por mais sete dias com seus novos donos; as cadelas treinadas foram acompanhadas desde seu dia zero da sua chegada ao abrigo, receberam neste mesmo dia seu primeiro treinamento que durava 15 minutos e tinha um percurso de 200 metros, foram castradas, passaram pela adaptação à presença do observador, depois de 28 dias foram colocadas para a adoção e foram acompanhadas por mais sete dias com seus novos donos.

Nesta avaliação foram mensurados diariamente (7:00 – 11:00 AM) os parâmetros fisiológicos (frequência cardíaca, frequência respiratória, taxa de oxigenação sanguínea, pulso arterial) e procedeu-se a coleta de saliva para medir os cortisol (BEERDA et al., 1996) e IL6. O etograma foi realizado semanalmente para não ser invasivo (ALTMANN, 1974). O treinamento deveria proporcionar aos animais expressões desejáveis de comportamento sem causar-lhes estresse, utilizando método de reforço positivo (FUKUZAWA; HAYASHI, 2013).

5.1.1 Avaliação Fisiológica

- A Temperatura corporal foi aferida da forma mais rápida possível, por meio de termômetro infravermelho auditivo, que era aferido todos os dias com um termômetro clínico de mercúrio, oferecendo variação na diferença das medições de 0.01°C.
- A Frequência respiratória foi avaliada por observação da amplitude torácica das cadelas, no espaço de 15 segundos e o resultado multiplicado por quatro.
- A Frequência cardíaca foi aferida com a utilização de um fonendoscópio por 15 segundos em duas tomadas, e o último resultado mais estável foi multiplicado por quatro.
- A Taxa de oxigenação sanguínea foi aferida por monitor multiparamétrico portátil, com pinça infravermelha de detecção e curva platismográfica de

acompanhamento, na base da orelha, sobre o ramo arterial auricular intermédio.

- A Pulsação arterial foi realizada por meio de monitor multiparamétrico portátil e pinça de infravermelho, aferida sobre o ramo arterial auricular intermédio.
- A Temperatura ambiental, acompanhada diariamente para monitoração das oscilações fisiológicas em decorrência climática, por meio do uso de termômetro infravermelho, à altura do corpo das cadelas.

5.1.2 Etograma

Este etograma avaliou 25 comportamentos quantitativos e 14 comportamentos qualitativos. A avaliação quantitativa abrangeu os comportamentos mais comuns observados (dados apresentados no capítulo 3) e avaliou a frequência dos eventos por hora de observação. A avaliação qualitativa conferiu nota de 1 a 9 para a intensidade dos eventos mais comuns. Considerou-se significativo quando $p < 0.05$.

Após a abordagem para avaliação fisiológica, o observador aguardava de 15 a 20 minutos sem movimentos bruscos e sem transitar pelo local, até as cadelas pararem de interagir com ele. A partir de então, iniciava-se a filmagem e as anotações dos comportamentos do cão. Eram acompanhadas quatro sessões de 5 minutos, intercaladas de 10 minutos de não observação, até completar uma hora. Uma destas sessões era utilizada de maneira aleatória, para avaliar a intensidade dos comportamentos manifestados para o etograma qualitativo.

O etograma abordou os seguintes comportamentos:

5.1.2.1 Medo

- Frequência de Tremor – tremor no corpo não decorrente da temperatura ambiental. Quando a temperatura ambiental foi menor que 18°C, este dado foi eliminado.
- Intensidade do Tremor – quanto o animal tremia em escala de 1 a 9, sendo 9 intensidade maior.
- Medo (reatividade) – qualquer demonstração de medo no ambiente em que vive.

5.1.2.2 Comunicação, de acordo com Beerda (BEERDA et al., 1998) e (BEERDA et al., 1999a):

- Levantar membros torácicos – animal eleva seu membro torácico tentando alcançar algo físico ou imaginário.
- Vocalização – produção de qualquer tipo de som oral (latir, grunhir, uivar).
- Abanar a cauda – intensidade de movimentação da cauda.
- Recepção – iniciativa da cadela de ir até o portão receber o instrutor, buscar o contato.
- Socializar – busca de fazer contato com outros animais.
- Boca aberta – manutenção da aboca entreaberta sem alteração no ângulo de abertura.
- Bocejar – o animal abre totalmente a boca em demonstração de sono.

- Movimentos com a boca – o animal abre a boca na metade de sua extensão, ou aparentemente morde o ar.
- Suspirar – animal faz uma inspiração lenta e profunda seguida de uma expiração rápida.
- Ofegar – aparência respiratória de cansaço.

5.1.2.3 *Interação com o meio*

- Frequência de Cheirar – vezes que o animal passa a focar seu farejar num único local.
- Intensidade de Cheirar – intensidade e o tempo destinado a cheirar um foco específico.
- Levanta-se nas paredes – o animal se levanta sobre os membros pélvicos, apoiando os torácicos contra as paredes do recinto.
- Exploração do ambiente – o animal passa a perceber o local cheirando rapidamente o entorno.
- Auto lambedura – ato em que o animal passa a se lambe em qualquer parte do corpo, como dedos, cauda, carpos.
- Lamber nariz – animal lambe especificamente o próprio nariz.
- Brincar – interesse do cão em expressar atividades lúdicas com outras cadelas ou com as pessoas do manejo.
- Alterar a postura – o animal muda a sua posição permanecendo no próprio local. Número de vezes que o animal se reposicionou.

5.1.2.4 *Conforto*

- Alongar – o animal se espreguiça, posta seus membros adiante, travando-os e inclina seu corpo para trás.
- Deitar – quantas vezes o animal se deitou.
- Sentar – quantas vezes o animal se sentou.
- Deitado com a cabeça baixa – o animal se deita com a cabeça repousada, descansando.
- Deitado com a cabeça elevada – o animal se deita mas com a cabeça erguida em alerta.
- Sentado – quanto tempo o animal permanece sentado.
- Alterar sua locomoção – o animal passa a se locomover ou para. Foram contabilizadas quantas vezes houve esta mudança.
- Frequência em Andar – o animal se movimenta pelo recinto de forma aleatória. Quantas vezes o movimento se iniciou.
- Intensidade em Andar – quanto tempo o animal permanece andando.
- Circular – o animal se move em círculos pequenos ou grandes. Difere do andar por ser repetitivo. Número de vezes que este movimento se iniciou.
- Andar lambendo – o animal passa a se lambar (lábios e nariz) enquanto anda.

5.1.3 Análise Estatística

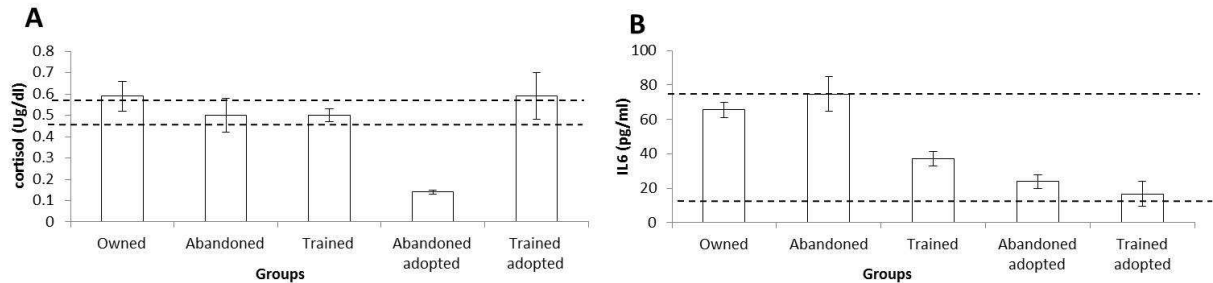
Os dados dos parâmetros fisiológicos foram pareados e usados testes de Mann-Whitney e t-Student. Os dados do etograma eram não paramétricos e utilizou-

se Kruskal-Wallis como pós teste. Foi realizado teste de correlação entre os dados de etograma e parâmetros fisiológicos utilizando Pearson para dados que aceitaram normalidade e Spearman para dados fora da normalidade. Para a determinação mínima e máxima de cortisol e IL6 foram delimitados normais os valores compreendidos entre 5% e 95% das amostras. Diferenças foram consideradas significativas para $p < 005$.

5.2 Resultados e discussão

O treinamento das cadelas de abrigos deveria prepará-los para o convívio familiar humano (TAKEUCHI et al., 2001). Frequentemente cadelas de abrigos apresentam fugas das residências ou demonstrações de agressividade (TAKEUCHI et al., 2001; SEGURSON; SERPELL; HART, 2005; CHRISTENSEN et al., 2007). Caso pudéssemos treinar estes animais para terem mais paciência com seus donos, talvez este convívio passasse a ser agradável. Porém é necessário reconhecer os padrões comportamentais que denunciam o que o cão está sentindo, e buscar os comportamentos espontâneos ideais. Com isto em mente, definimos os níveis normais de cortisol para cadelas de proprietários e de abrigos e encontramos níveis mínimo e máximo de 0.45 e 0.57 ug/dl respectivamente (n=671) (figura 11A), indicando situação de eustresse. No entanto estes valores de cortisol encontram-se abaixo de 0.906-1.993 ug/dl conforme a literatura (HAVERBEKE et al., 2008) indica em cadelas militares da Bélgica para caracterizar o eustresse, o que provavelmente está relacionado ao desenho experimental, que mediu cortisol em situações diferentes. (STAFFORD et al., 2012). Neste estudo também determinamos os níveis normais de IL6 para cadelas (n=651) que foram determinados entre 11.9 e 75.21 pg/ml respectivamente. No entanto, como não existe descrição específica de valores de IL6 para cadelas na literatura, não pudemos comparar estes resultados, originais para a espécie até o momento (figura 11B).

Figura 11 - Níveis médios dos hormônios do estresse encontrado nos grupos com donos, abandonados, treinados, abandonados após adoção e treinados após a adoção



Fonte: (LESNAU, G.G., 2014).

Legenda: Níveis médios dos hormônios do estresse encontrado nos grupos com donos, abandonados, treinados, abandonados após adoção e treinados após a adoção, barras indicam erro padrão de cada grupo, linha pontilhada inferior indica limite mínimo (5%) de normalidade da população avaliada e linha pontilhada superior indica limite máximo de normalidade da população avaliada, sendo A para cortisol (indicador de estresse crônico; n=671) e B para IL6 (indicador de estresse agudo; n=651).

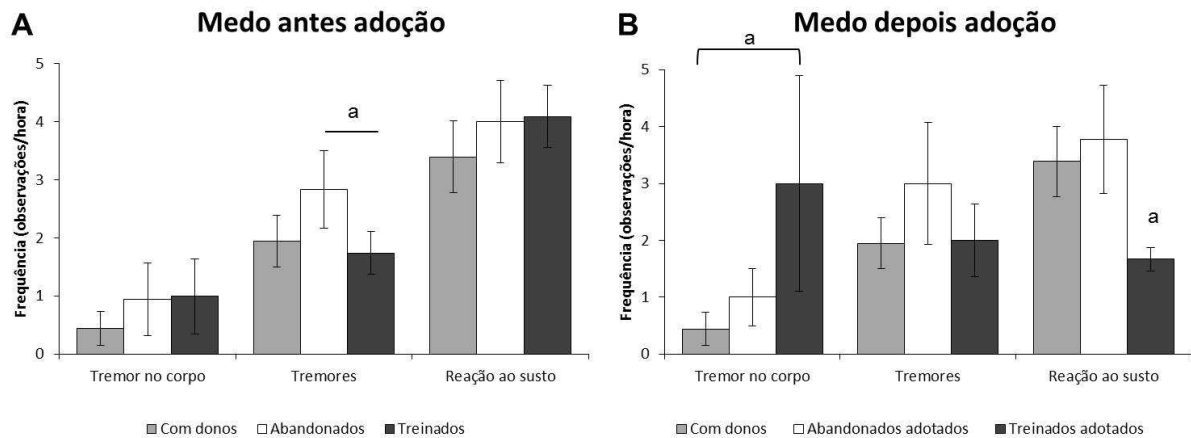
Trabalhos com ratos demonstraram que exercícios físicos moderados estimulam a cognição, reduzem o estresse e a liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL6) (GOMES DA SILVA et al., 2013), e aplicamos estes conceitos em cadelas abrigadas, visando embasar as melhorias no bem estar destes animais no abrigo e na nova residência após a adoção.

Foram agrupados trinta e um comportamentos em quatro grandes grupos: medo, comunicação, interações com o meio e desconforto. As cadelas foram estudadas em grupos distintos: com donos, abandonadas sem treino (designadas de abandonadas), abandonadas treinadas (designadas de treinadas), abandonadas sem treino depois de adotadas (designadas abandonadas adotadas) e abandonadas treinadas depois de adotadas (designadas de treinadas adotadas), considerando as cadelas com donos o nosso grupo controle.

O primeiro padrão comportamental avaliado foi o medo, que envolvia a frequência de tremores, sua intensidade e reação ao susto (BEERDA et al., 1997; BEERDA et al., 1999a; HENNESSY et al., 2001; LUCIDI et al., 2005). Neste estudo a incidência de tremores e a intensidade destes tremores apresentaram correlação significativa positiva em cadelas abandonadas ($r=0.6055$; $p=0.0077$) e cadelas abandonadas adotadas ($r=0.7839$; $p=0.0124$), o que nos chamou a atenção, pois

não há esta correlação nas cadelas com dono, cadelas treinadas e treinadas adotadas. O grupo treinado reduziu significativamente sua reação ao susto após a adoção ($p=0.0426$) (Figura 12), mas manteve a frequência ($p=0.7435$) e a intensidade dos tremores ($p=0.7054$). Houve redução na frequência cardíaca e melhoria na condição respiratória das cadelas treinadas após a adoção. Quanto ao hormônio cortisol, os grupos com dono e treinado adotado apresentaram média superior ao nível máximo da normalidade calculada nesta situação ($+0.02$ ug/dL) e o abandonado adotado apresentou cortisol muito abaixo do mínimo esperado (-0.31 ug/dL). Para IL6 todos os grupos apresentaram médias dentro dos limites mínimo e máximo calculados para este experimento. O cortisol não apresentou tendência a correlação negativa com o medo ($r= -0.73$; $p=0.0994$), mas IL6 apresentou correlação negativa ($r=-0.9962$; $p<0.0001$). O tremor não apresentou correlação com os hormônios estudados, portanto, pode-se inferir que a reação ao susto seria uma resposta por previsibilidade de experiências negativas (DÖRING et al., 2009; DRESCHEL, NANCY., 2010), fato não detectado nas cadelas treinadas. Assim, o estresse imediato não gera a sensação de medo necessariamente, mas quando este estresse provoca a ansiedade constante, desenvolve adaptação à sensação de medo (MCEWEN, BRUCE. et al., 2012; LEUNER; SHORS, 2013) levando à previsibilidade futura, o que se reflete em ansiedade (DRESCHEL, NANCY., 2010; O'DONOVAN et al., 2010; LEUNER; SHORS, 2013; PASSALACQUA et al., 2013). Em humanos, este tremor independente do medo foi estudado em situações de alegria extrema, e algumas pessoas com transtorno de conversão apresentam tremores na demonstração de alegria por haver conectividade entre a amígdala e regiões associadas com a preparação motora (VOON et al., 2010). As cadelas treinadas e posteriormente adotadas que apresentaram tremores no corpo, não demonstraram comportamento de medo, apresentaram níveis hormonais de cortisol altos e IL6 baixos, e demonstravam excitação como reflexo de alegria extrema. As atividades, mesmo estressantes que não causem traumas (adestramento), podem modelar e até suprimir a reação ao susto pelo reforço positivo (FUKUZAWA; HAYASHI, 2013), pois estas cadelas tiveram redução significativa do susto apresentado antes e depois da adoção.

Figura 12 - Gráficos representativos do padrão comportamental de Medo entre os três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção



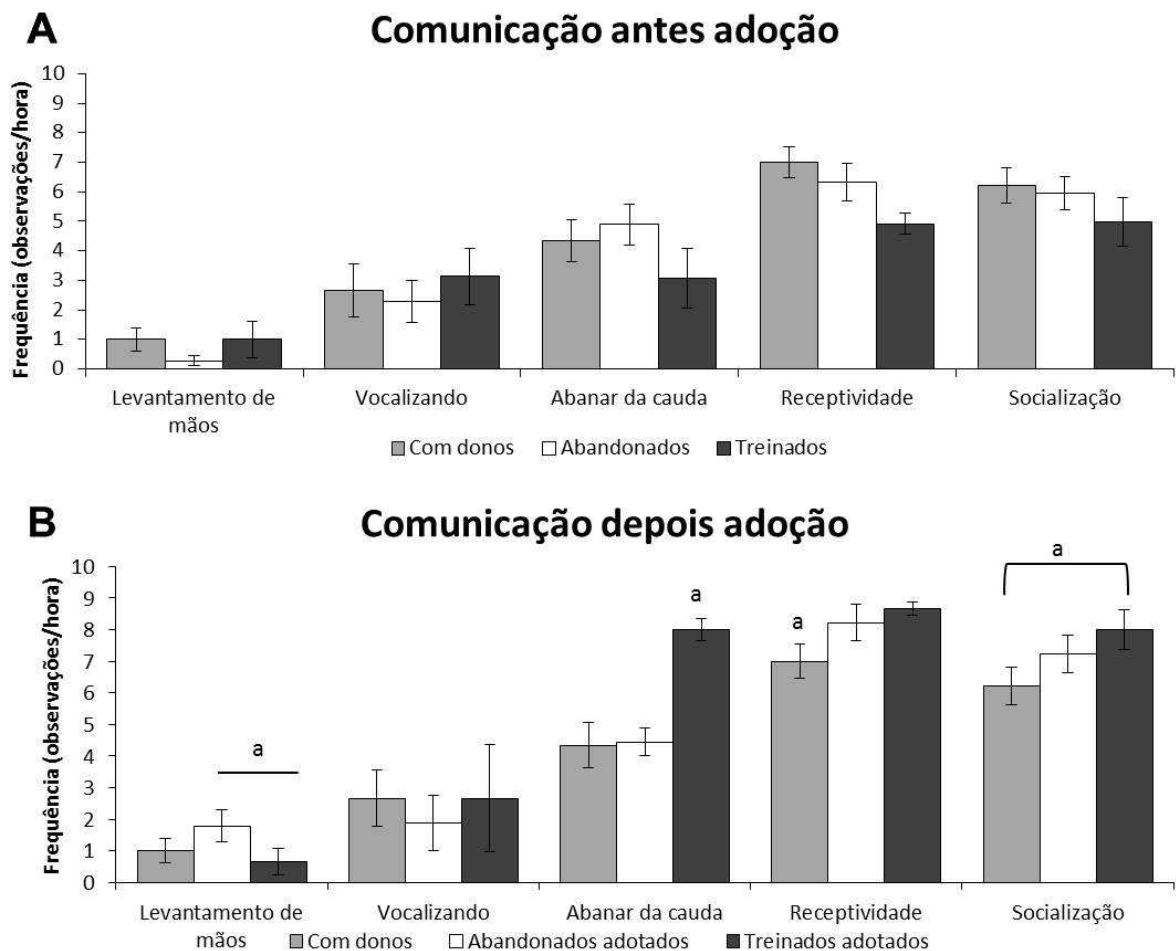
Fonte: (LESNAU, G.G., 2014).

Legenda: Gráficos representativos do padrão comportamental de Medo entre os três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção, considerando o grupo Com Donos como grupo controle. As barras indicam a média da frequência das observações, barras verticais no gráfico indicam \pm SEM, letras indicam diferença significativa com $p < 0.05$.

O segundo padrão comportamental avaliado foi a tentativa de comunicação das cadelas em interação com o enriquecimento animado (pessoas, outros animais), que abrangeu o levantamento do membro torácico (mão) (PASSALACQUA et al., 2013), a vocalização (KING et al., 2000; HENNESSY et al., 2001; HAVERBEKE et al., 2008; KERSWELL et al., 2009), abanar a cauda. (SINISCALCHI et al., 2013), intensidade da receptividade e a socialização (BEERDA et al., 2000). A tentativa de comunicação é complexa, pois envolve muita expressão corporal passível de interpretação (ELGIER et al., 2009; KAMINSKI et al., 2009; MIKLÓSI, 2009; GAUNET, 2010; MEROLA et al., 2013; PETAK, 2013; SINISCALCHI et al., 2013), porém, foi possível identificar da mesma forma que Miklósi, uma busca constante de comunicação das cadelas abandonados adotados com seus novos donos (MIKLÓSI, 2009) conforme os etogramas foram realizados. Cadelas abandonados depois de adotados levantaram mais as mãos do que previamente à adoção, porém, os abandonados adotados não apresentaram outra forma mais evidente de comunicação com os donos. Já as cadelas treinadas, abanaram mais a cauda do que todos os outros grupos. Ao contrário do que Wells e Hepper descreveram (WELLS; HEPPEL, 2000a), a vocalização não apresentou diferença entre os grupos. Estes comportamentos comunicativos levaram as cadelas treinadas, quando

adotadas, a desenvolverem uma receptividade e socialização significativamente maiores que as cadelas com donos avaliados em suas residências (Figura 13). Esta maior interação ocorreu nos indivíduos com cortisol mais alto e valores de IL6 mais próximos dos limites mínimos estabelecidos.

Figura 13 - Gráficos representativos do padrão comportamental de Tentativa de comunicação e interação com o enriquecimento animado entre os três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção



Fonte: (LESNAU, G.G., 2014).

Legenda: Gráficos representativos do padrão comportamental de Tentativa de comunicação e interação com o enriquecimento animado entre os três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção, considerando o grupo Com Donos como grupo controle. As barras indicam a média da frequência das observações, barras verticais no gráfico indicam \pm SEM, letras indicam diferença significativa com $p < 0.05$.

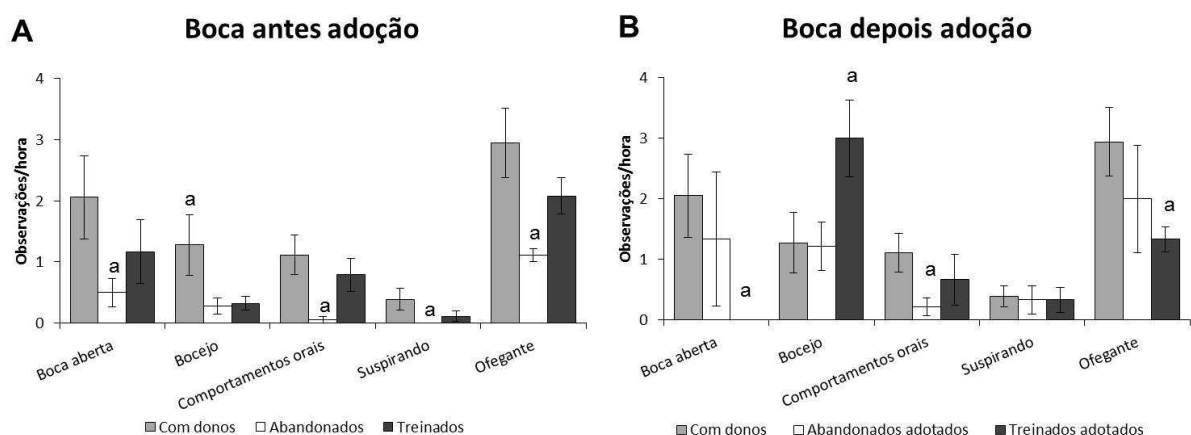
Ainda quanto à comunicação, avaliamos a expressão facial envolvendo a boca, com a manutenção da boca aberta, bocejar, suspirar, ofegar (ALTMANN, 1974; STAFFORD et al., 2012). O comportamento mais marcante foi o bocejo, presente nas cadelas abandonados adotados e treinados adotados, sendo que antes da adoção, este comportamento teve frequência mínima. Trabalhos realizados com este comportamento mostram que o bocejo é contagioso (BUTTNER; STRASSER, 2013; ROMERO; KONNO; HASEGAWA, 2013; SILVA; BESSA; DE SOUSA, 2013; SWEENEY; BLACKBURN, 2013), porém pode ter base ontogenética (MADSEN; PERSSON, 2013). Nossos resultados não discutem a origem do aprendizado do bocejo, mas o porquê dele ocorrer nos animais adotados com maior frequência do que quando estão em um abrigo. Ao avaliarmos os parâmetros fisiológicos, notamos uma redução na frequência cardíaca dos animais treinados depois de adotados, porém houve manutenção da diferença significativamente maior na taxa de oxigenação sanguínea. O comportamento de ofegar após a adoção também diminuiu significativamente nas cadelas treinados, corroborando com a respiração mais eficiente dos animais. Os exercícios antes da adoção eram aeróbicos, o que capacitaram o organismo a manter taxas mais altas de oxigênio circulante e para manter estas taxas, o limite mínimo de oxigenação para manutenção deste estado, também subiu. Assim, fisiologicamente, a taquicardia ou taquipnéia só seriam desencadeadas mediante hipóxia, por meio de uma acidose respiratória. Este estágio, porém, por ser bioquímico, mantém-se distante do limiar de oxigenação do funcionamento de um corpo exercitado, e quando a oxigenação sanguínea entra neste limite entre a baixa oxigenação, ainda antes da hipóxia, o bocejo é desencadeado (AIRES, 2008) possibilitando o incremento imediato de oxigênio com apenas um movimento inspiratório para elevar essa taxa de oxigênio. (SILVA; BESSA; DE SOUSA, 2013). Esta argumentação segue as conclusões obtidas também por outros autores (SILVA; BESSA; DE SOUSA, 2013). Sendo assim, o bocejo não está relacionado a estresse (ROMERO; KONNO; HASEGAWA, 2013), mas uma compensação de oxigenação de tempos em tempos para comunicar sobrecarga do sistema autonômico e a necessidade de retirada de estimulação sensorial. (SWEENEY; BLACKBURN, 2013). Nossos resultados

mostraram que as cadelas treinadas adotados que apresentavam mais bocejos em casa também apresentaram maior nível de cortisol do que quando estavam no abrigo, concordando com literatura mais recente (BUTTNER; STRASSER, 2013) que indica o bocejo como um sinal comunicativo com aqueles que coabitam no mesmo espaço e entre os quais existe certa empatia. (ROMERO; KONNO; HASEGAWA, 2013).

O bocejo apresentou correlação direta com a frequência respiratória ($r=0.7627$, $p=0.0168$) em cadelas com donos e com a taxa de oxigenação em cadelas abandonados ($r=0.7143$, $p=0.0306$) e treinados ($r=0.9375$, $p=0.0057$) após a adoção. Portanto, a rotina e a falta de novidades faz com que as cadelas entrem em estado de tédio e desatenção, baixando a oxigenação e elevando a frequência de bocejos.

Cadelas treinadas apresentaram maior frequência de ofego antes da adoção (Figura 14), havendo correlação entre ofegar e frequência respiratória na primeira avaliação do grupo treinado ($r=0.75$; $p=0.0193$), muito provavelmente por não estarem preparados fisicamente, uma vez que esta correlação não mais ocorreu nas avaliações subsequentes. A correlação de ofegar surge novamente com a frequência cardíaca ($r=-0.89$; $p=0.002$) após o treinamento de maneira negativa. Com a frequência dos exercícios as cadelas deixaram de ofegar, como observado pela baixa frequência de observações após a adoção das cadelas treinadas.

Figura 14 - Gráficos representativos do padrão comportamental de movimentos com a boca entre os três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção



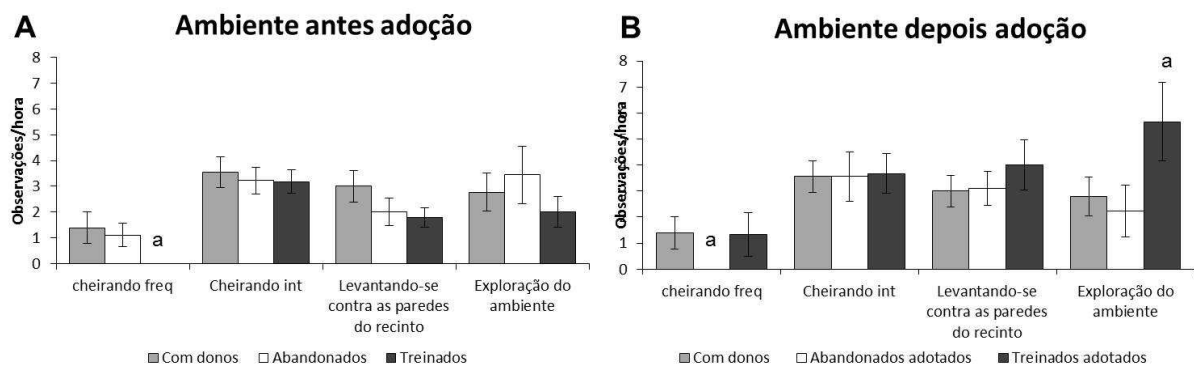
Fonte: (LESNAU, G.G., 2014).

Legenda: Gráficos representativos do padrão comportamental de movimentos com a boca entre os três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção, considerando o grupo Com Donos como grupo controle. As barras indicam a média da frequência das observações, barras verticais no gráfico indicam \pm SEM, letras indicam diferença significativa com $p < 0.05$.

O terceiro padrão comportamental foi a interação com o meio ambiente e/ou distração com o enriquecimento inanimado (brinquedos, móveis, cômodos, objetos), consistindo em reunir os comportamentos de cheirar (frequência), cheirar (intensidade), levantar-se contra as paredes, explorar o ambiente (HAVERBEKE et al., 2008). O grupo abandonado manteve-se estável antes e depois da adoção, sem alterações nas frequências e intensidade de seus comportamentos de interação, porém, as cadelas treinadas adotadas, passaram a cheirar (frequência até então não registrada no abrigo), mas mantiveram a intensidade, aumentaram o número de vezes que se levantaram contra as paredes e notoriamente, exploraram muito mais o ambiente em relação às cadelas com donos ou abandonados. Sugerimos que cheirar seja um comportamento que necessite de um etograma específico, devido às grandes variações de frequência e poucas de intensidade, a fim de interpretar melhor este comportamento conforme sugerido por outros autores (ALTMANN, 1974; BEERDA et al., 1999a; STAFFORD et al., 2012). As informações deste trabalho foram inconclusivas quando correlacionado este parâmetro comportamental com os fisiológicos e hormonais. A exploração do ambiente das cadelas treinadas adotadas foi significativamente maior e as cadelas se mantiveram ativas, independente da interação com os proprietários. Essa característica de interação com o ambiente já foi descrita como desejável e indicadora de boa qualidade de bem estar, pois se espera que o cão interaja com os objetos e percorra os cômodos do ambiente em que vive. (WELLS, 2004; TAYLOR; MILLS, 2007). As condições após a adoção foram semelhantes aos dois grupos de animais de abrigo e acabaram se assemelhando às condições dos animais de proprietários: nenhum animal recebeu treinamento ou teve contato interativo com o avaliador após a adoção, porém, os animais treinados estavam preparados para interagir muito bem com a nova família e novo ambiente (Figura 15). O grupo de abandonados apresentou correlação negativa entre o cortisol e a exploração do ambiente ($r = -0.7514$; $p = 0.0195$). Quando há uma interação moderada com humanos, é detectada a redução de cortisol nas cadelas, reduzindo o medo, estresse e a vocalização

(SHIVERDECKER; SCHIML; HENNESSY, 2013). Portanto, comprova-se o benefício comportamental e de saúde mental das cadelas quando são adotados já treinados.

Figura 15 - Gráficos representativos do padrão comportamental de Interação com o ambiente e o enriquecimento inanimado das cadelas dos três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção



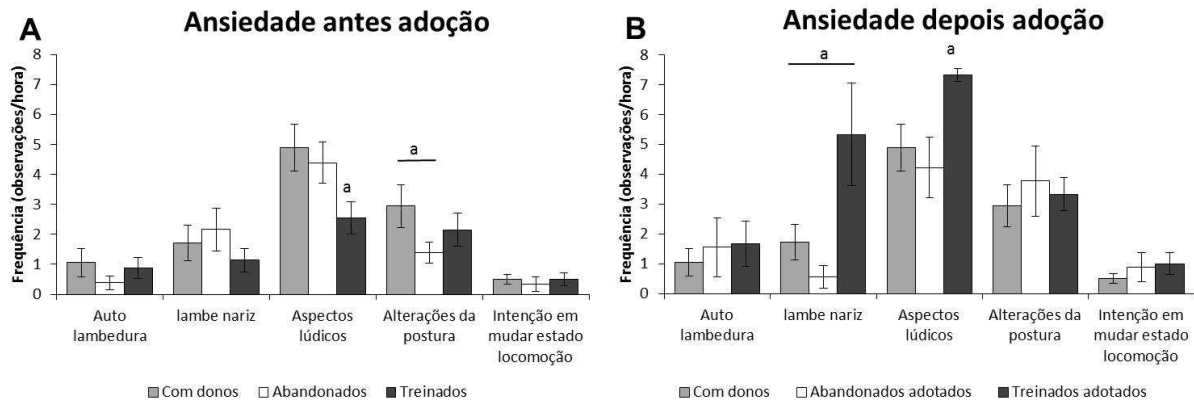
Fonte: (LESNAU, G.G., 2014).

Legenda: Gráficos representativos do padrão comportamental de Interação com o ambiente e o enriquecimento inanimado das cadelas dos três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção, considerando o grupo Com Donos como grupo controle. As barras indicam a média da frequência das observações, barras verticais no gráfico indicam \pm SEM, letras indicam diferença significativa com $p < 0.05$.

A avaliação de interação com o meio também incluiu sinais de ansiedade como a auto lambedura (HAVERBEKE et al., 2008), intenção em mudar o estado de locomoção, lambe o nariz, aspectos lúdicos. (brincadeiras)(BEBAK; BECK, 1993) e alteração de postura conforme apontado em diversos trabalhos (BEERDA et al., 1999a; HENNESSY et al., 2001; PASSALACQUA et al., 2013). Esta ansiedade surge em todos os grupos antes da adoção sem diferenças significativas, mas diminui significativamente no grupo abandonado adotado e aumenta muito no grupo treinado adotado (Figura 6), o que condiz com o quadro de ansiedade e excitação que se torna benéfico em níveis moderados para o aprendizado (PASSALACQUA et al., 2013). Lambe o nariz é um comportamento de eustresse (ASCHBACHER et al., 2013), como forma de ansiedade moderada e previsibilidade. Difere-se da ansiedade da separação que é patológica (BLACKWELL; CASEY; BRADSHAW, 2006). As brincadeiras surgiram mais intensamente após a adoção no grupo

treinado, porém, não se pode afirmar a partir dos resultados que o cão brinque mais por ter sido treinado. O que ocorre é uma busca constante de interação com a família. O grupo com donos ou abandonados (antes e depois da adoção) não alteraram seu comportamento de brincar, não foram treinados após o período estipulado, não foram treinados após a adoção, portanto, não possuíam conhecimento ensinado de formas alternativas de comunicação com os seus donos. Existem estudos que abordaram a leitura facial dos donos feita pelas cadelas (EKMAN, 1993; 1994; RUSSELL, 1995; BLOOM; FRIEDMAN, 2013) revelando a interpretação que as cadelas fazem de seus donos, se estes demonstram aceitação ou satisfação pelo seu comportamento. Pode-se sugerir que o treinamento realizado no presente estudo preparou as cadelas para entenderem as expressões faciais dos donos e comandos orais (VIRÁNYI et al., 2008; POULSEN; LISLE; PHILLIPS, 2010; FUKUZAWA; HAYASHI, 2013). Isto justifica o contínuo aprendizado e interação das cadelas com seus novos donos após a adoção, mesmo após os treinamentos terem sido cessados (MEYER; LADEWIG, 2008; DIESEL, 2011). Cadelas treinadas adotados possuem correlação positiva entre brincar e o pulso arterial ($r=0.8846$, $p=0.0192$), mas não apresentam correlação entre brincar e hormônios ($p>0.05$), o que sugere que a motivação para as brincadeiras seja comportamental e cognitiva (ROONEY; BRANDSHAW; ROBINSON, 2001; GAUNET, 2010). As cadelas abandonados, antes da sua adoção, apresentaram-se com um perfil hormonal de estresse agudo (BEERDA et al., 1997; IZAWA et al., 2013a), evitando interações, passando grande parte do tempo sentadas e alterando pouco sua postura, o que mudou após a adoção e estas diferenças significativas não ocorreram mais (Figura 16).

Figura 16 - Gráficos representativos do padrão comportamental de Ansiedade entre os três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção



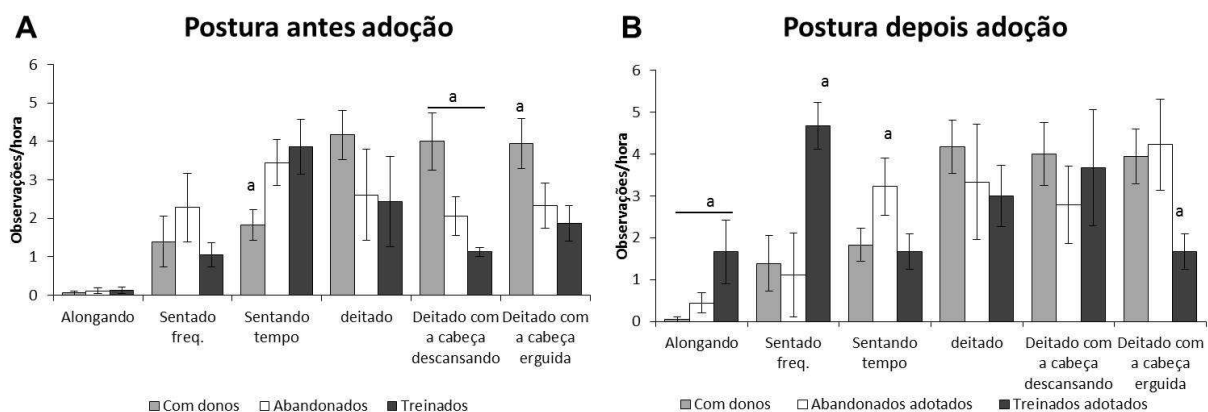
Fonte: (LESNAU, G.G., 2014).

Legenda: Gráficos representativos do padrão comportamental de Ansiedade entre os três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção, considerando o grupo Com Donos como grupo controle. As barras indicam a média da frequência das observações, barras verticais no gráfico indicam \pm SEM, letras indicam diferença significativa com $p < 0.05$.

O quarto parâmetro comportamental avaliou a postura de conforto das cadelas, mensurando a frequência de alongamentos, de vezes que as cadelas deitaram, sentaram, o tempo que permaneceram deitadas com a cabeça ao chão ou elevada e tempo que permaneceram sentados (HAVERBEKE et al., 2008). A frequência de vezes que as cadelas deitaram ficou estável antes e depois da adoção, porém, o tempo que passaram deitados variou bastante. Antes da adoção, cadelas abandonadas e cadelas treinadas deitaram menos do que cadelas com donos, seja com a cabeça no chão ou levantada. Após a adoção estas diferenças deixaram de ser significativas, exceto para o grupo treinado adotado, que se manteve com baixa frequência em deitar com a cabeça erguida; em compensação, aumentou a frequência de se sentar. Cadelas abandonadas, por não terem sido estimuladas a explorar o ambiente e descobrir brincadeiras, passaram a maior parte do tempo deitadas com a cabeça no chão o que está associado a um perfil de depressão hormonal (BEERDA et al., 2000), o que aumenta o risco de desenvolver comportamentos estereotipados. (HAVERBEKE et al., 2008). Não acreditamos que o treinamento tenha alguma contribuição no comportamento de sentar, apesar de haver um dos comandos para esta atividade, porque antes da adoção, cadelas

treinadas apresentaram frequência significativamente menor e após a adoção, foram as abandonadas que tiveram maior tempo sentadas. Durante os treinamentos no abrigo, o tempo sentado foi realmente maior, pois havia a expectativa do bom comportamento ser recompensado com um agrado (FUKUZAWA; HAYASHI, 2013), mas nas casas esta rotina de treinos não ocorreu e portanto a permanência das cadelas na posição sentada não surtiria muito efeito (NORMANDO et al., 2009). Por fim, o alongamento foi muito mais frequente em cadelas treinadas adotadas (os outros grupos não apresentaram este comportamento com frequência passível de avaliação, Figura 17)

Figura 17 - Gráficos representativos do padrão comportamental da postura das cadelas dos três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção



Fonte: (LESNAU, G.G., 2014).

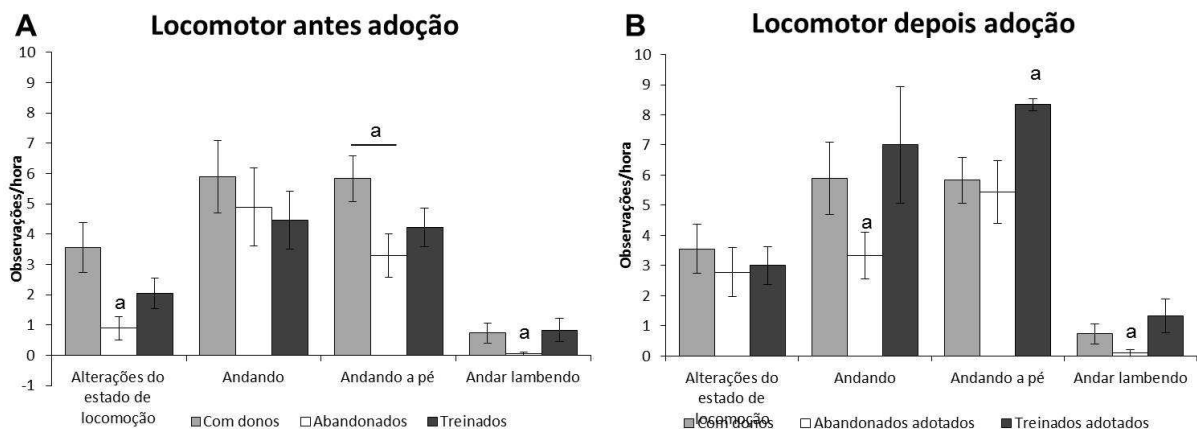
Legenda: Gráficos representativos do padrão comportamental da postura das cadelas dos três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção, considerando o grupo Com Donos como grupo controle. As barras indicam a média da frequência das observações, barras verticais no gráfico indicam \pm SEM, letras indicam diferença significativa com $p < 0.05$.

Ainda no que diz respeito à avaliação do conforto, seguiu-se com o acompanhamento das atividades motoras como a alteração do estado de locomoção (BEERDA et al., 2000), frequência com que o animal se locomoveu, intensidade de seu andar, intensidade de seu circular no mesmo ponto ou se apresentou auto lambedura, o que aponta para um quadro de conforto ou euforia. (SHIVERDECKER; SCHIML; HENNESSY, 2013). Inicialmente, cadelas com donos foram mais inquietas, alterando mais seu estado de locomoção, andando mais frequentemente, porém a

partir da adoção, o grupo de treinados adotados andou mais. A frequência do andar e o tempo destinado a esta atividade estão correlacionados ($r=0.5010$; $p<0.0001$) e configuram a euforia das cadelas treinadas após terem sido adotados. Este comportamento de inquietação refina os dados vistos anteriormente sobre a interação com o ambiente. Como as cadelas foram avaliadas nas condições mais próximas ao cotidiano das famílias, esta euforia acompanhou negativamente os valores de cortisol já descritos anteriormente ($r=-0.7539$; $p=0.0307$), mas discordam de dados já publicados por Shiverdecker e al (SHIVERDECKER; SCHIML; HENNESSY, 2013), uma vez que seus estudos avaliaram animais de abrigos, mas não nas residências, constando uma redução de excitação nos animais. Devemos considerar as diferenças (ALTMANN, 1974) e as formas combinadas para avaliação de um comportamento (GRANGER et al., 2007). Nossos dados contribuem para a afirmativa de que o contato humano reduz o estresse e a excitação, porque as cadelas abandonadas quando adotadas passaram a andar menos do que no abrigo, porém a intensidade (tempo de deambulação) foi a mesma e os níveis de cortisol foram mais baixos (Lesnau; Sousa; Papa, 2014 - submetido). Entretanto, os sinais interativos destes animais eram de depressão (andavam e exploravam pouco o ambiente, passavam o tempo deitados) (Figura 18) assim como os hormônios (cortisol e IL6) estavam mais baixos do que os demais grupos. Shiverdecker et al (SHIVERDECKER; SCHIML; HENNESSY, 2013) apontam para um comportamento de calma como ausência de estresse, porém, nossos estudos apontam que esta suposta “calmaria” seja reflexo de falta de bem-estar (SHIVERDECKER; SCHIML; HENNESSY, 2013). Pode-se dizer que as cadelas deste estudo se comunicaram com todas as partes de seu corpo e com seus movimentos. O tipo e intensidade do andar mostraram muito o que a cadela estava sentindo e devido à variedade de ambientes em que foram estudadas (casa, abrigo, sob treinamento, em seu novo lar após adoção), denunciam a necessidade de estudos mais refinados sobre o andar para classificar esta comunicação. Apenas as cadelas treinadas após a adoção apresentaram correlação de andar com os parâmetros fisiológicos: frequência cardíaca ($r=-0.9891$; $p=0.0002$), frequência respiratória ($r=-0.933$; $p=0.0065$) e taxa de oxigenação sanguínea ($r=0.8768$; $p=0.0218$), e indicam que esta agitação estava

relacionada positivamente à oxigenação e negativamente à frequência cardíaca e respiratória, mas que não foi possível inferir o estado destes animais.

Figura 18 - Gráficos representativos do padrão comportamental de Euforia e conforto percebido pelas cadelas dos três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção



Fonte: (LESNAU,G.G., 2014).

Legenda: Gráficos representativos do padrão comportamental de Euforia e conforto percebido pelas cadelas dos três grupos, antes (A) e depois (B) da adoção, considerando o grupo Com Donos como grupo controle. As barras indicam a média da frequência das observações, barras verticais no gráfico indicam \pm SEM, letras indicam diferença significativa com $p < 0.05$.

Por fim, quanto aos hormônios conferidos com cada comportamento indicam que os níveis elevados de cortisol não foram sinônimos de estresse, contrariando Hennessy (HENNESSY et al., 1997) e tenderam a baixar nos abrigos quando há interação humana conforme já citado por Shiverdecker et al (SHIVERDECKER; SCHIML; HENNESSY, 2013). As cadelas treinadas adotadas apresentaram níveis de cortisol mais elevados, porém sem nenhum sinal de distresse. Nos casos em que havia uma falta de compromisso dos proprietários com suas cadelas, ou seja, aqueles não lhes reservavam um tempo mínimo de atenção, percebeu-se que as cadelas apresentaram os seguintes níveis hormonais: 1- cadelas abandonadas adotadas por pessoas que não conferem atenção apresentaram cortisol baixo e IL6 baixa; 2- cadelas treinadas adotadas por pessoas que não conferem atenção apresentaram cortisol alto e IL6 baixa. De fato houve uma oscilação de cortisol,

sendo que o perfil de IL6 se manteve o mesmo nestes casos. A adoção foi extremamente benéfica ao equilíbrio imunológico dos animais, não gerou estresse agudo (indicado pela IL6), mas como o grupo das cadelas abandonadas não foram preparadas para esta mudança de ambiente e interações, desenvolveram um quadro depressivo, demonstrado por níveis mais baixos de cortisol. As cadelas abandonadas antes da adoção apresentaram valores de cortisol (0.5 ± 0.08 ug/dL) e de IL6 (74.59 ± 10.01 pg/ml) dentro dos limites de normalidade, porém, estes níveis de cortisol caíram abaixo dos valores mínimos (-0.31 ug/dL) e IL6 apesar de estar dentro dos valores de normalidade, houve uma queda de 50.8 pg/ml em relação ao período em que estiveram no abrigo. Assim observou-se um quadro de depressão conforme já descrito por outros autores que estudam depressão em humanos (BARDEN, 2004; JULIO-PIEPER; DINAN, 2010). Normalmente quando há uma situação de estresse significativo no primeiro momento e uma forte queda destes hormônios em seguida, o quadro de depressão se manifesta. Alguns indivíduos dentro de uma população terem predisposição para a depressão é normal, mas o grupo todo de animais não parentados apresentarem este quadro, é de se questionar o processo das adoções de rotina.

Já as cadelas treinadas, depois de adotadas, apresentaram IL6 em níveis próximos do mínimo estabelecido (16.73 ± 7.39 pg/ml), porém a diferença entre o período de treinamento e a adoção foi de 20.33 pg/ml, e cortisol foi mantido seu nível (0.5 ± 0.03 ug/dL antes da adoção e $0.59 \pm 0,11$ ug/dL após a adoção). Esta estabilidade de cortisol manteve as cadelas ativas em virtude da rotina de treinamentos e interação.

Em resumo, foram detectadas as emoções de estresse crônico nas cadelas com donos, apresentando cortisol e IL6 altos, animais ofegantes e com a boca aberta, que procuram brincar, a frequência e a intensidade de andar são equivalentes e grandes, com frequência cardíaca normal e taxa de oxigenação baixa. Nas cadelas abandonadas o quadro era de estresse agudo, com cortisol em níveis normais e IL6 elevados, animais com demonstração de medo associado a tremores intensos do corpo, abanam bastante a cauda, alteram pouco sua postura e estado de locomoção (ficam mais estáticos, “congelados”), não se lambem, passam

muito tempo sentados, com frequência respiratória mais baixa. Quando estas cadelas abandonadas foram adotadas, seu quadro evoluiu para depressão, com cortisol baixo e IL6 baixo também, mantendo a sensação de medo e tremores no corpo após cinco dias na nova casa, quase não lambem o nariz, vocalizam pouco, procuram se comunicar levantando a mão, não se interessam em cheirar quando exploram o ambiente, andam pouco e por pouco tempo, passam boa parte do tempo deitados com a cabeça erguida ou sentados, sem alterações da normalidade da frequência cardíaca, respiratória, taxa de oxigenação do sangue ou pulso. Cadelas treinadas antes da adoção apresentaram perfil de normalidade, com cortisol normal e IL6 em valores mais baixos. O padrão comportamental não apontou nenhuma característica em evidência. Demonstraram reação ao susto, porem com poucos tremores no corpo, não apresentavam movimentos estereotipados como lambadura de nariz, não abanavam a cauda em demasia, não exploraram o ambiente de forma incessante, não se locomoveram na maior parte do tempo. Porém, estes animais estavam mais atentos a tudo que os cercava, tomando assim o tempo das brincadeiras e não focavam sua atenção a apenas uma pessoa e quando se deitavam, faziam ainda com a cabeça erguida. Sua frequência cardíaca, respiratória, taxa de oxigenação do sangue e pulsação foram mais elevadas que os demais grupos. Cadelas treinados adotados apresentaram-se excitados e alegres, com cortisol alto, IL6 baixa, não apresentaram manutenção de boca aberta, bocejavam bastante, não se apresentaram ofegantes, reduzem drasticamente o medo (mas os tremores do corpo podem aumentar por outros motivos), lambem muito o nariz e brincam quase o tempo todo, abanam muito a cauda, são muito receptivas e sociais, exploram o ambiente o tempo todo, andam muito e reduzem, portanto o tempo deitadas são os animais que realmente se alongam, sua frequência cardíaca é baixa, mas a frequência respiratória e a taxa de oxigenação são altas.

5.3 Conclusões

Concluimos neste estudo que as cadelas apresentam pelo menos cinco emoções distintas, capazes de classificar o grau de bem estar que estão sentindo no ambiente: estresse crônico, estresse agudo, normalidade, depressão e disposição. As ferramentas mais indicadas para este diagnóstico foram o etograma correlacionado às dosagens de Cortisol e IL6 concomitantes e também os parâmetros fisiológicos.

6 CONSIDERAÇÕES/CONCLUSÕES GERAIS

Os cães possuem emoções bem definidas e o ser humano ainda não encontrou uma metodologia não-verbal de extrair estas informações. Nosso estudo demonstrou que a IL6 é um excelente indicador de estresse agudo e que o cortisol não indica necessariamente o estresse crônico ou agudo, pelo contrário, é essencial para a interação dos indivíduos com o meio, pois animais com cortisol baixo apresentaram quadro de depressão. É de extrema importância que os cães tenham um ambiente enriquecido, para que desenvolvam sua sociabilidade. O comportamento aparentemente tranquilo de um cão não significa que o mesmo não esteja sofrendo com estresse. Todos os animais que enfrentaram desafios e mantiveram o cortisol mais elevado, conseguiram superar melhor a situação de estresse. Há correlação entre os padrões comportamentais e a variação de cortisol e IL6, indicando no conjunto, o estado emocional do cão, porém, isoladamente, os testes aplicados (etograma e etoteste) ou mesmo os perfis de cortisol e IL6 não são muito eficientes, pois não refinam o estado emocional. O programa de ressocialização, por meio de adestramento simplificado, obteve êxito em sua proposta, pois socializou os animais já no primeiro dia de abrigo, manteve a estabilidade do fator pró-inflamatório (IL6), contornou a situação de estresse e inseriu cães mais alegres na adoção que buscavam constantemente a interação com os novos donos. Até mesmo procedimentos cirúrgicos não desencadearam aumento de IL6 apenas com o uso do treinamento. Portanto, a avaliação de bem estar agora, deverá levar em consideração não somente as concentrações de cortisol, como também o padrão comportamental que os animais estão apresentando em um determinado ambiente.

REFERÊNCIAS

- ACCO, A.; PACHALY, J. R.; BACILA, M. Síndrome do estresse em animais - revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia, UNIPAR**, v. 2, n. 1, p. 71-76, 1999.
- ACCORSI, P. A. Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. **General and Comparative Endocrinology**, v. 155, p. 398–402, 2008.
- AGUILERA, G. HPA axis responsiveness to stress: implications for healthy aging. **Exp Gerontol**, v. 46, n. 2-3, p. 90-95, 2011.
- AIRES, M. D. M. **Fisiologia**: Guanabara Koogan, 2008. 1252 p.
- ALTMANN, J. Observational study of behavior: sampling methods (Review). **Behaviour**, v. 49, n. 3-4, p. 227-267, 1974.
- APPLEBY, D. L.; BRADSHAW, J. W.; CASEY, R. A. Relationship between aggressive and avoidance behaviour by dogs and their experience in the first six months of life. **Vet Rec**, v. 150, n. 14, p. 434-438, 2002.
- ARHANT, C.; BUBNA-LITTITZ, H.; BARTELS, A.; FUTSCHIK, A.; TROXLER, J. Behaviour of smaller and larger dogs: Effects of training methods, inconsistency of owner behaviour and level of engagement in activities with the dog **Applied Animal Behaviour Science**, v. 123, p. 131-142, 2010.
- ASCHBACHER, K.; O'DONOVAN, A.; WOLKOWITZ, O. M.; DHABHAR, F. S.; SU, Y.; EPEL, E. Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 9, p. 1698-1708, 2013.
- BARDEN, N. Implication of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the physiopathology of depression. **J Psychiatry Neurosci**, v. 29, n. 3, p. 185-193, 2004.
- BEBAK, J.; BECK, A. M. The effect of cage size on play and aggression between dogs in purpose-bred beagles. **Lab Anim Sci**, v. 43, n. 5, p. 457-459, 1993.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; JANSSEN, N. S. C. R. M.; MOL, J. A. The Use of Saliva Cortisol, Urinary Cortisol, and Catecholamine Measurements for a Noninvasive Assessment of Stress Responses in Dogs. **Hormones and Behavior**, v. 30, n. 3, p. 272-279, 1996.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; DE VRIES, H. W. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. **Applied Animal Behaviour Science** 52 (1997) 307-319, v. 52, p. 307-319, 1997a.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; DE VRIES, H. W.; MOL, J. A. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 58, n. 3-4, p. 365-381, 1998.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B.; VAN HOOFF, J. A.; DE VRIES, H. W.; MOL, J. A. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses. **Physiol Behav**, v. 66, n. 2, p. 233-242, 1999a.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B.; BERNADINA, W.; VAN HOOFF, J. A.; DE VRIES, H. W.; MOL, J. A. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses. **Physiol Behav**, v. 66, n. 2, p. 243-254, 1999b.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; DE VRIE, H. W.; MOLL, J. A. Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. **Animal Welfare**, v. 9, n., p. 49-62, 2000.

BEKOFF, M. Animal reflections. **Nature**, v. 419, n. 6904, p. 255, 2002.

BENNETT, P. C.; ROHLF, V. I. Owner-companion dog interactions: Relationships between demographic variables, potentially problematic behaviours, training engagement and shared activities **Applied Animal Behaviour Science**, v. 102, p. 65-84, 2007.

BERGERON, R.; SCOTT, S. L.; ÉMOND, J.-P.; MERCIER, F.; COOK, N. J.; SCHAEFER, A. L. Physiology and behavior of dogs during air transport. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 211-216, 2002.

BLACK, P. H. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. **Brain Behav Immun**, v. 16, n. 6, p. 622-653, 2002.

BLACK, P. H. The inflammatory response is an integral part of the stress response: Implications for atherosclerosis, insulin resistance, type II diabetes and metabolic syndrome X. **Brain Behav Immun**, v. 17, n. 5, p. 350-364, 2003.

BLACKWELL, E.; CASEY, R. A.; BRADSHAW, J. W. Controlled trial of behavioural therapy for separation-related disorders in dogs. **Vet Rec**, v. 158, n. 16, p. 551-554, 2006.

BLOOM, T.; FRIEDMAN, H. Classifying dogs' (*Canis familiaris*) facial expressions from photographs. **Behav Processes**, v. 96, p. 1-10, 2013.

BOISSY, A.; MANTEUFFEL, G.; JENSEN, M. B.; MOE, R. O.; SPRUIJT, B.; KEELING, L. J.; WINCKLER, C.; FORKMAN, B.; DIMITROV, I.; LANGBEIN, J.; BAKKEN, M.; VEISSIER, I.; AUBERT, A. Assessment of positive emotions in animals to improve their welfare. **Physiol Behav**, v. 92, n. 3, p. 375-397, 2007.

BRAEM, M. D.; MILLS, D. S. Factors affecting response of dogs to obedience instruction: A field and experimental study **Applied Animal Behaviour Science**, v. 125, p. 47-55, 2010.

BROOM, D. M. The Scientific Assessment of Animal Welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 20, p. 5-19, 1988.

BUTTNER, A. P.; STRASSER, R. Contagious yawning, social cognition, and arousal: an investigation of the processes underlying shelter dogs' responses to human yawns. **Anim Cogn**, 2013.

CALL, J.; BRÄUER, J.; KAMINSKI, J.; TOMASELLO, M. Domestic dogs (*Canis familiaris*) are sensitive to the attentional state of humans. **J Comp Psychol**, v. 117, n. 3, p. 257-263, 2003.

CAMPISI, J.; BRAVO, Y.; COLE, J.; GOBEIL, K. Acute psychosocial stress differentially influences salivary endocrine and immune measures in undergraduate students. **Physiol Behav**, v. 107, n. 3, p. 317-321, 2012.

CARPENTER, L. L.; GAWUGA, C. E.; TYRKA, A. R.; LEE, J. K.; ANDERSON, G. M.; PRICE, L. H. Association between plasma IL-6 response to acute stress and early-life adversity in healthy adults. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 13, p. 2617-2623, 2010.

CARROLL, J. E.; LOW, C. A.; PRATHER, A. A.; COHEN, S.; FURY, J. M.; ROSS, D. C.; MARSLAND, A. L. Negative affective responses to a speech task predict changes in interleukin (IL)-6. **Brain Behav Immun**, v. 25, n. 2, p. 232-238, 2011.

CHAITANYA, V. S.; LAVANIA, M.; NIGAM, A.; TURANKAR, R. P.; SINGH, I.; HORO, I.; SENGUPTA, U.; JADHAV, R. S. Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal) reactions of leprosy. **Immunol Lett**, v. 156, n. 1-2, p. 159-167, 2013.

CHRISTENSEN, E. L.; SCARLETT, J.; CAMPAGNA, M.; HOUPPT, K. A. Aggressive behavior in adopted dogs that passed a temperament test **Applied Animal Behaviour Science**, v. 106, p. 85–95, 2007.

COPPOLA, C. L.; GRANDIN, T.; ENNS, R. M. Human interaction and cortisol: can human contact reduce stress for shelter dogs? **Physiol Behav**, v. 87, n. 3, p. 537-541, 2006.

CREEL, S. Dominance, aggression, and glucocorticoid levels in social carnivores. **Journal of Mammalogy**, v. 86, n. 2, p. 255–264, 2005.

DALLA VILLA, P.; BARNARD, S.; DI FEDE, E.; PODALIRI, M.; CANDELORO, L.; DI NARDO, A.; SIRACUSA, C.; SERPELL, J. A. Behavioural and physiological responses of shelter dogs to long-term confinement. **Vet Ital**, v. 49, n. 2, p. 231-241, 2013.

DE ALMEIDA, A. A.; GOMES DA SILVA, S.; FERNANDES, J.; PEIXINHO-PENA, L. F.; SCORZA, F. A.; CAVALHEIRO, E. A.; ARIDA, R. M. Differential effects of exercise intensities in hippocampal BDNF, inflammatory cytokines and cell proliferation in rats during the postnatal brain development. **Neurosci Lett**, v. 553, p. 1-6, 2013.

DEVITT, C. M.; COX, R. E.; HAILEY, J. J. Duration, complications, stress, and pain of open ovariohysterectomy versus a simple method of laparoscopic-assisted ovariohysterectomy in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 227, n. 6, p. 921-927, 2005.

DEVRIES, A. C.; GLASPER, E. R.; DETILLION, C. E. Social modulation of stress responses. **Physiol Behav**, v. 79, n. 3, p. 399-407, 2003.

DIESEL, G. Reducing stress in dogs in shelters. **Vet Rec**, v. 169, n. 15, p. 386-387, 2011.

DÖRING, D.; ROSCHER, A.; SCHEIPL, F.; KÜCHENHOFF, H.; ERHARD, M. H. Fear-related behaviour of dogs in veterinary practice. **Vet J**, v. 182, n. 1, p. 38-43, 2009.

DOWLING-GUYER, S.; MARDER, A.; D'ARPINO, S. Behavioral traits *detected in shelter dogs* by a behavior evaluation: secondary title. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 130, p. 107-114 2011.

DRESCHER, N. A.; GRANGER, D. A. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. **Horm Behav**, v. 55, n. 1, p. 163-168, 2009.

DRESCHER, N. A. The effects of fear and anxiety on health and lifespan in pet dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 125, p. 157–162, 2010.

DUFFY, D. L.; HSU, Y.; SERPELL, J. A. Breed differences in canine aggression. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, p. 441–460, 2008.

EIGLER, N.; SACCA, L.; SHERWIN, R. S. Synergistic interactions of physiologic increments of glucagon, epinephrine, and cortisol in the dog: a model for stress-induced hyperglycemia. **J Clin Invest**, v. 63, n. 1, p. 114-123, 1979.

EKMAN, P. Facial expression and emotion. **Am Psychol**, v. 48, n. 4, p. 384-392, 1993.

ELGIER, A. M.; JAKOVCEVIC, A.; BARRERA, G.; MUSTACA, A. E.; BENTOSELA, M. Communication between domestic dogs (*Canis familiaris*) and humans: Dogs are good learners. **Behavioural Processes**, v. 81, n. 3, p. 402-408, 2009.

FITZGERALD, L.; MACEY, P.; BRECHT, M. L. Pathways to interleukin-6 in healthy males and serious leisure male athletes: physical activity, body composition and age. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e40513, 2012.

FUKUZAWA, M.; HAYASHI, N. Comparison of 3 different reinforcements of learning in dogs (*Canis familiaris*). **Journal of Veterinary Behavior**, v. 8, p. 221-224, 2013.

GÁCSI, M.; TOPÁL, J.; MIKLÓSI, A.; DÓKA, A.; CSÁNYI, V. Attachment behavior of adult dogs (*Canis familiaris*) living at rescue centers: forming new bonds. **J Comp Psychol**, v. 115, n. 4, p. 423-431, 2001.

GALOSY, R. A.; CLARKE, L. K.; MITCHELL, J. H. Cardiac changes during behavioral stress in dogs. **Am J Physiol**, v. 236, n. 5, p. H750-758, 1979.

GAUNET, F. How do guide dogs and pet dogs (*Canis familiaris*) ask their owners for their toy and for playing? **Anim Cogn**, v. 13, n. 2, p. 311-323, 2010.

GOMES DA SILVA, S.; SIMÕES, P. S.; MORTARA, R. A.; SCORZA, F. A.; CAVALHEIRO, E. A.; DA GRAÇA NAFFAH-MAZZACORATTI, M.; ARIDA, R. M. Exercise-induced hippocampal anti-inflammatory response in aged rats. **J Neuroinflammation**, v. 10, p. 61, 2013.

GRANGER, D. A.; KIVLIGHAN, K. T.; FORTUNATO, C.; HARMON, A. G.; HIBEL, L. C.; SCHWARTZ, E. B.; WHEMBOLUA, G. L. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: problems and solutions for collecting specimens. **Physiol Behav**, v. 92, n. 4, p. 583-590, 2007.

HAMER, M.; SABIA, S.; BATTY, G. D.; SHIPLEY, M. J.; TABÁK, A. G.; SINGH-MANOUX, A.; KIVIMAKI, M. Physical activity and inflammatory markers over 10 years: follow-up in men and women from the Whitehall II cohort study. **Circulation**, v. 126, n. 8, p. 928-933, 2012.

HAUBENHOFER, D.; KIRCHENGAST, S. Dog Handlers and Dogs' Emotional and Cortisol Secretion Responses Associated with Animal-assisted Therapy Sessions **Society and Animals**, v. 15, p. 127-150, 2007.

HAYERBEKE, A.; DIEDERICH, C.; DEPIEREUX, E.; GIFFROY, J. M. Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. **Physiol Behav**, v. 93, n. 1-2, p. 59-67, 2008.

HEINRICH, P. C.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANN, H. M.; MÜLLER-NEUEN, G.; SCHAPER, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochem J**, v. 374, pt. 1, p. 1-20, 2003.

HEKMAN, J. P.; KARAS, A. Z.; DRESCHER, N. A. Salivary cortisol concentrations and behavior in a population of healthy dogs hospitalized for elective procedures. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 141, p. 149-157, 2012.

HENNESSY, M. B. Effects of social partners on pituitary-adrenal activity during novelty exposure in adult female squirrel monkeys. **Physiol Behav**, v. 38, n. 6, p. 803-807, 1986.

HENNESSY, M. B.; RITCHEY, R. L. Hormonal and behavioral attachment responses in infant guinea pigs. **Dev Psychobiol**, v. 20, n. 6, p. 613-625, 1987.

HENNESSY, M. B.; NIGH, C. K.; SIMS, M. L.; LONG, S. J. Plasma cortisol and vocalization responses of postweaning age guinea pigs to maternal and sibling separation: evidence for filial attachment after weaning. **Dev Psychobiol**, v. 28, n. 2, p. 103-115, 1995.

HENNESSY, M. B.; DAVIS, H. N.; WILLIAMS, M. T.; MELLOTT, C.; DOUGLAS, C. W. Plasma cortisol levels of dogs at a county animal shelter. **Physiol Behav**, v. 62, n. 3, p. 485-490, 1997.

HENNESSY, M. B.; WILLIAMS, M. T.; MILLER, D. D.; DOUGLAS, C. W.; VOITH, V. L. Influence of male and female petters on plasma cortisol and behaviour: can human interaction reduce the stress of dogs in a public animal shelter? **Applied Animal Behaviour Science**, v. 61, p. 63-77, 1998.

HENNESSY, M. B.; VOITH, V. L.; MAZZEI, S. J.; BUTTRAM, J.; MILLER, D. D.; LINDEN, F. Behavior and cortisol levels of dogs in a public animal shelter, and an exploration of the ability of these measures to predict problem behavior after adoption. **Appl Anim Behav Sci**, v. 73, n. 3, p. 217-233, 2001.

HENNESSY, M. B.; VOITH, V. L.; YOUNG, T. L.; HAWKE, J. L.; CENTRONE, J.; MCDOWELL, A. L.; LINDEN, F.; DAVENPORT, G. M. Exploring human interaction and diet effects on the behavior of dogs in a public animal shelter. **J Appl Anim Welf Sci**, v. 5, n. 4, p. 253-273, 2002.

HENNESSY, M. B.; MORRIS, A.; LINDEN, F. Evaluation of the effects of a socialization program in a prison on behavior and pituitary–adrenal hormone levels of shelter dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 99, n., p. 157–171, 2006.

HERD, J. A. Cardiovascular response to stress. **Physiol Rev**, v. 71, n. 1, p. 305-330, 1991.

HØGÅSEN, H. R.; ER, C.; DI NARDO, A.; DALLA VILLA, P. Free-roaming dog populations: a cost-benefit model for different management options, applied to Abruzzo, Italy. **Prev Vet Med**, v. 112, n. 3-4, p. 401-413, 2013.

HYDBRING-SANDBERG, E.; VON WALTER, L. W.; HÖGLUND, K.; SVARTBERG, K.; SWENSON, L.; FORKMAN, B. Physiological reactions to fear provocation in dogs. **J Endocrinol**, v. 180, n. 3, p. 439-448, 2004.

IZAWA, S.; MIKI, K.; LIU, X.; OGAWA, N. The diurnal patterns of salivary interleukin-6 and C-reactive protein in healthy young adults. **Brain Behav Immun**, v. 27, n. 1, p. 38-41, 2013a.

IZAWA, S.; SUGAYA, N.; KIMURA, K.; OGAWA, N.; YAMADA, K. C.; SHIROTSUKI, K.; MIKAMI, I.; HIRATA, K.; NAGANO, Y.; NOMURA, S. An increase in salivary interleukin-6 level following acute psychosocial stress and its biological correlates in healthy young adults. **Biol Psychol**, v. 94, n. 2, p. 249-254, 2013b.

JULIO-PIEPER, M.; DINAN, T. G. The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Depression. Depression: From Psychopathology to Pharmacotherapy. **Mod Trends Pharmacopsychiatry**, v. 27, p. 20-31, 2010.

KAMINSKI, J.; BRÄUER, J.; CALL, J.; TOMASELLO, M. Domestic dogs are sensitive to a human's perspective. **Behaviour**, v. 146, p. 979-998, 2009.

KERSWELL, K. J.; BENNETT, P.; BUTLER, K. L.; HEMSWORTH, P. H. The relationship of adult morphology and early social signalling of the domestic dog (*Canis familiaris*). **Behav Processes**, v. 81, n. 3, p. 376-382, 2009.

KING, J. N.; SIMPSON, B. S.; OVERALL, K. L.; APPLEBY, D.; PAGEAT, P.; ROSS, C.; CHAURAND, J. P.; HEATH, S.; BEATA, C.; WEISS, A. B.; MULLER, G.; PARIS, T.; BATAILLE, B. G.; PARKER, J.; PETIT, S.; WREN, J. Treatment of separation anxiety in dogs with clomipramine: results from a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multicenter clinical trial. **Appl Anim Behav Sci**, v. 67, n. 4, p. 255-275, 2000.

KOBELT, A. J.; HEMSWORTH, P. H.; BARNETT, J. L.; BUTLER, K. L. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. **Res Vet Sci**, v. 75, n. 2, p. 157-161, 2003.

KUNZ-EBRECHT, S. R.; MOHAMED-ALI, V.; FELDMAN, P. J.; KIRSCHBAUM, C.; STEPTOE, A. Cortisol responses to mild psychological stress are inversely associated with proinflammatory cytokines. **Brain Behav Immun**, v. 17, n. 5, p. 373-383, 2003.

LEUNER, B.; SHORS, T. J. Stress, anxiety, and dendritic spines: what are the connections? **Neuroscience**, v. 251, p. 108-119, 2013.

LUCIDI, P.; BERNABO, N.; PANUNZI, M.; DALLA VILLA, P.; MATTIOLI, M. Ethotest: A new model to identify (shelter) dogs skills as service animals or adoptable pets **Applied Animal Behaviour Science**, v. 95, p. 103–122, 2005.

LUESCHER, A. U.; MEDLOCK, R. T. The effects of training and environmental alterations on adoption success of shelter dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 117, p. 63-68, 2009.

LUND, J. D.; JØRGENSEN, M. C. Behaviour patterns and time course of activity in dogs with separation problems **Applied Animal Behaviour Science**, v. 63, p. 219–236, 1999.

MADSEN, E. A.; PERSSON, T. Contagious yawning in domestic dog puppies (*Canis lupus familiaris*): the effect of ontogeny and emotional closeness on low-level imitation in dogs. **Anim Cogn**, v. 16, n. 2, p. 233-240, 2013.

MASON, J. W. A historical view of the stress field. **J Human Stress**, v. 1, n. 2, p. 22-36 concl, 1975.

MCEWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiol Rev**, v. 87, n. 3, p. 873-904, 2007.

MCEWEN, B. S.; EILAND, L.; HUNTER, R. G.; MILLER, M. M. Stress and anxiety: Structural plasticity and epigenetic regulation as a consequence of stress. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 3-12, 2012.

MEROLA, I.; PRATO-PREVIDE, E.; LAZZARONI, M.; MARSHALL-PESCINI, S. Dogs' comprehension of referential emotional expressions: familiar people and familiar emotions are easier. **Anim Cogn**, 2013.

MEYER, I.; LADEWIG, J. The relationship between number of training sessions per week and learning in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 111, n. 3-4, p. 311-320, 2008.

MEYER, T. N.; DA SILVA, A. L. [Cell response to stress]. **Rev Assoc Med Bras**, v. 45, n. 2, p. 181-188, 1999.

MIKLÓSI, A. Evolutionary approach to communication between humans and dogs. **Vet Res Commun**, v. 33 Suppl 1, p. 53-59, 2009.

MINEKA, S.; SUOMI, S. J. Social separation in monkeys. **Psychol Bull**, v. 85, n. 6, p. 1376-1400, 1978.

NAS, K.; CEVIK, R.; BATUM, S.; SARAC, A. J.; ACAR, S.; KALKANLI, S. Immunologic and psychosocial status in chronic fatigue syndrome. **Bratisl Lek Listy**, v. 112, n. 4, p. 208-212, 2011.

NGUYEN, K. T.; DEAK, T.; OWENS, S. M.; KOHNO, T.; FLESHNER, M.; WATKINS, L. R.; MAIER, S. F. Exposure to acute stress induces brain interleukin-1beta protein in the rat. **J Neurosci**, v. 18, n. 6, p. 2239-2246, 1998.

NORMANDO, S.; CORAIN, L.; SALVADORETTI, M.; MEERS, L.; VALSECCHI, P. Effects of an Enhanced Human Interaction Program on shelter dogs' behaviour analysed using a novel nonparametric test **Applied Animal Behaviour Science**, v. 116, p. 211-219, 2009.

O'DONOVAN, A.; HUGHES, B. M.; SLAVICH, G. M.; LYNCH, L.; CRONIN, M. T.; O'FARRELLY, C.; MALONE, K. M. Clinical anxiety, cortisol and interleukin-6: evidence for specificity in emotion-biology relationships. **Brain Behav Immun**, v. 24, n. 7, p. 1074-1077, 2010.

OBAYASHI, K. Salivary mental stress proteins. **Clin Chim Acta**, v. 425, n., p. 196-201, 2013.

ODENDAAL, J. S.; MEINTJES, R. A. Neurophysiological correlates of affiliative behaviour between humans and dogs. **Vet J**, v. 165, n. 3, p. 296-301, 2003.

OHIRA, H.; OSUMI, T.; MATSUNAGA, M.; YAMAKAWA, K. Pro-inflammatory cytokine predicts reduced rejection of unfair financial offers. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 34, n. 1, p. 47-51, 2013.

PACE, T. W.; NEGI, L. T.; SIVILLI, T. I.; ISSA, M. J.; COLE, S. P.; ADAME, D. D.; RAISON, C. L. Innate immune, neuroendocrine and behavioral responses to psychosocial stress do not predict subsequent compassion meditation practice time. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, n. 2, p. 310-315, 2010.

PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C.; EL-BAHR, S. M.; MÖSTL, E. Stress Hormones in Mammals and Birds: Comparative Aspects Regarding Metabolism, Excretion, and Noninvasive Measurement in Fecal Samples Ann. N.Y. **Acad. Sci.**, v. 1040, p. 162–171, 2005.

PASSALACQUA, C.; MARSHALL-PESCINI, S.; MEROLA, I.; PALESTRINI, C.; PREVIDE, E. P. Different problem-solving strategies in dogs diagnosed with anxiety-related disorders and control dogs in an unsolvable task paradigm. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 147, n. 1–2, p. 139-148, 2013.

PAUL, E. S.; HARDING, E. J.; MENDEL, M. Measuring emotional processes in animals: the utility of a cognitive approach. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 29, n. 3, p. 469-491, 2005.

PAULO, E. D. S. Lei nº 12.916 de 16 de abril de 2008: secondary title. São Paulo, São Paulo: **Imprensa Oficial**, 2008. 118, 1 p.

PAVLOVA, O. G.; MATS, V. N.; PONOMAREV, V. N. [Role of the motor cortex in the control of axial and proximal muscles in learning]. **Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova**, v. 62, n. 3, p. 322-331, 2012.

PELEGRINO, E. **Estudo identifica perfil de animais abandonados em Londrina: secondary title**, 2013.

PERNAMBUCO, E. D. Lei nº 14.139, de 31 de agosto de 2010: secondary title. **Diário Oficial do Estado de Pernambuco** - Poder Executivo: PALÁCIO DO CAMPO DAS PRINCESAS, 2010. Ano LXXXVII, 3 p.

PETAK, I. Communication patterns within a group of shelter dogs and implications for their welfare. **J Appl Anim Welf Sci**, v. 16, n. 2, p. 118-139, 2013.

POULSEN, A. H.; LISLE, A. T.; PHILLIPS, C. J. An evaluation of a behaviour assessment to determine the suitability of shelter dogs for rehoming. **Vet Med Int**, v. 2010, n., p. 523781, 2010.

PULLEN, A. J.; MERRILL, R. J.; BRADSHAW, J. W. Habituation and dishabituation during object play in kennel-housed dogs. **Anim Cogn**, v. 15, n. 6, p. 1143-1150, 2012.

PULLEN, A. J.; MERRILL, R. J.; BRADSHAW, J. W. The effect of familiarity on behavior of kenneled dogs during interactions with conspecifics. **J Appl Anim Welf Sci**, v. 16, n. 1, p. 64-76, 2013.

RITCHEY, R. L.; HENNESSY, M. B. Cortisol and behavioral responses to separation in mother and infant guinea pigs. **Behav Neural Biol**, v. 48, n. 1, p. 1-12, 1987.

ROMERO, T.; KONNO, A.; HASEGAWA, T. Familiarity bias and physiological responses in contagious yawning by dogs support link to empathy. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71365, 2013.

ROONEY, N. J.; BRANDSHAW, J. W. S.; ROBINSON, I. H. Do dogs respond to play signals given by humans? **Animal Behaviour**, v. 61, n., p. 715-722, 2001.

RUSSELL, J. A. Facial expressions of emotion: what lies beyond minimal universality? **Psychol Bull**, v. 118, n. 3, p. 379-391, 1995.

SCHOMMER, N. C.; HELLHAMMER, D. H.; KIRSCHBAUM, C. Dissociation between reactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic-adrenal-medullary system to repeated psychosocial stress. **Psychosom Med**, v. 65, n. 3, p. 450-460, 2003.

SHIER, D. M.; OWINGS, D. H. Effects of social learning on predator training and postrelease survival in juvenile black-tailed prairie dogs, *Cynomys ludovicianus* **Animal Behaviour**, v. 73, p. 567-577, 2007.

SEGURSON, S. A.; SERPELL, J. A.; HART, B. L. Evaluation of a behavioral assessment questionnaire for use in the characterization of behavioral problems of dogs relinquished to animal shelters. **J Am Vet Med Assoc**, v. 227, n. 11, p. 1755-1761, 2005.

SESAY, A. M.; MICHELI, L.; TERVO, P.; PALLESCHI, G.; VIRTANEN, V. Development of a competitive immunoassay for the determination of cortisol in human saliva. **Anal Biochem**, v. 434, n. 2, p. 308-314, 2013.

SHARMA, M.; BAIRY, I.; PAI, K.; SATYAMOORTHY, K.; PRASAD, S.; BERKOVITZ, B.; RADHAKRISHNAN, R. Salivary IL-6 levels in oral leukoplakia with dysplasia and its clinical relevance to tobacco habits and periodontitis. **Clin Oral Investig**, v. 15, n. 5, p. 705-714, 2011.

SHIVERDECKER, M. D.; SCHIML, P. A.; HENNESSY, M. B. Human interaction moderates plasma cortisol and behavioral responses of dogs to shelter housing. **Physiol Behav**, v. 109, p. 75-79, 2013.

SILVA, K.; BESSA, J.; DE SOUSA, L. Familiarity-connected or stress-based contagious yawning in domestic dogs (*Canis familiaris*)? Some additional data. **Anim Cogn**, v. 16, n. 6, p. 1007-1009, 2013.

SINISCALCHI, M.; LUSITO, R.; VALLORTIGARA, G.; QUARANTA, A. Seeing Left- or Right-Asymmetric Tail Wagging Produces Different Emotional Responses in Dogs. **Curr Biol**, v., p., 2013.

SIRACUSA, C.; MANTECA, X.; CUENCA, R.; DEL MAR ALCALÁ, M.; ALBA, A.; LAVÍN, S.; PASTOR, J. Effect of a synthetic appeasing pheromone on behavioral, neuroendocrine, immune, and acute-phase perioperative stress responses in dogs. **J Am Vet Med Assoc**, v. 237, n. 6, p. 673-681, 2010.

SOLOMON, R. L.; KAMIN, L. J.; WYNNE, L. C. Traumatic avoidance learning: the outcomes of several extinction procedures with dogs. **J Abnorm Psychol**, v. 48, n. 2, p. 291-302, 1953.

SPARRENBERGER, F.; DOS SANTOS, I.; LIMA, R. A. C. [Epidemiology of psychological distress: a population-based cross-sectional study]. **Rev Saude Publica**, v. 37, n. 4, p. 434-439, 2003.

STAFFORD, R.; GOODENOUGH, A. E.; SLATER, K.; CARPENTER, W.; COLLINS, L.; CRUICKSHANK, H.; DOWNING, S.; HALL, S.; MCDONALD, K.; MCDONNELL, H.; OVERS, B.; SPIERS, L.; STETTER, M.; ZITZER, H.; HART, A. G. Inferential and visual analysis of ethogram data using multivariate techniques. **Animal Behaviour**, v. 83, p. 563-569, 2012.

STARLING, M. J.; BRANSON, N.; CODY, D.; MCGREEVY, P. D. **Conceptualising the Impact of Arousal and Affective State on Training Outcomes of Operant Conditioning Animals**, v. 3, p. 300-317, 2013.

STEPHEN, J. M.; LEDGER, R. A. A longitudinal evaluation of urinary cortisol in kennelled dogs, *Canis familiaris*. **Physiol Behav**, v. 87, n. 5, p. 911-916, 2006.

STEPTOE, A.; WILLEMSSEN, G.; OWEN, N.; FLOWER, L.; MOHAMED-ALI, V. Acute mental stress elicits delayed increases in circulating inflammatory cytokine levels. **Clin Sci (Lond)**, v. 101, n. 2, p. 185-192, 2001.

SWEENEY, J. K.; BLACKBURN, S. Neonatal physiological and behavioral stress during neurological assessment. **J Perinat Neonatal Nurs**, v. 27, n. 3, p. 242-252; quiz 253-244, 2013.

TAKEUCHI, Y.; OGATA, N.; HOUP, K. A.; SCARLETT, J. M. Differences in background and outcome of three behavior problems of dogs. **Appl Anim Behav Sci**, v. 70, n. 4, p. 297-308, 2001.

TAYLOR, K. D.; MILLS, D. S. The effect of the kennel environment on canine welfare: A critical review of experimental studies. **Animal Welfare**, v. 16, n. 4, p. 435-447, 2007.

TOPÁL, J.; GÁCSI, M.; MIKLÓSI, Á.; VIRÁNYI, Z.; KUBINYI, E.; CSÁNYI, V. Attachment to humans: a comparative study on hand-reared wolves and differently socialized dog puppies **Animal Behaviour**, v. 70, p. 1367-1375, 2005.

TUBER, D. S.; SANDERS, S.; HENNESSY, M. B.; MILLER, J. A. Behavioral and glucocorticoid responses of adult domestic dogs (*Canis familiaris*) to companionship and social separation. **J Comp Psychol**, v. 110, n. 1, p. 103-108, 1996.

VAN ROSSUM, E. F.; KOPER, J. W.; HUIZENGA, N. A.; UITTERLINDEN, A. G.; JANSSEN, J. A.; BRINKMANN, A. O.; GROBBEE, D. E.; DE JONG, F. H.; VAN DUYN, C. M.; POLS, H. A.; LAMBERTS, S. W. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene, which decreases sensitivity to glucocorticoids in vivo, is associated with low insulin and cholesterol levels. **Diabetes**, v. 51, n. 10, p. 3128-3134, 2002.

VANAK, A. T.; GOMPPER, M. E. Dogs *Canis familiaris* as carnivores: their role and function in intraguild competition **Mammal Rev.**, v. 39, n. 4, p. 265-283, 2009.

VICEDO, M. The father of ethology and the foster mother of ducks: Konrad Lorenz as expert on motherhood. **Isis**, v. 100, n. 2, p. 263-291, 2009.

VINCENT, I. C.; MICHELL, A. R. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. **Res Vet Sci**, v. 53, n. 3, p. 342-345, 1992.

VIRÁNYI, Z.; GÁCSI, M.; KUBINYI, E.; TOPÁL, J.; BELÉNYI, B.; UJFALUSSY, D.; MIKLÓSI, A. Comprehension of human pointing gestures in young human-reared wolves (*Canis lupus*) and dogs (*Canis familiaris*). **Anim Cogn**, v. 11, n. 3, p. 373-387, 2008.

VOON, V.; BREZING, C.; GALLEA, C.; AMELI, R.; ROELOFS, K.; LAFRANCE, W. C.; HALLETT, M. Emotional stimuli and motor conversion disorder. **Brain**, v. 133, n. Pt 5, p. 1526-1536, 2010.

VOŠLÁROVÁ, E.; PASSANTINO, A. Stray dog and cat laws and enforcement in Czech Republic and in Italy. **Ann Ist Super Sanita**, v. 48, n. 1, p. 97-104, 2012.

VUCINIC, M.; DJORDJEVIC, M.; TEODOROVIC, R.; JANKOVIC, L.; RADENKOVIC-DAMNJANOVIC, B.; RADISAVLJEVIC, K. Reasons for relinquishment of owned dogs in a municipal shelter in Belgrade. **Acta Veterinaria (Beograd)**, v. 59, n. 2-3, p. 309-317, 2009.

WELLS, D. L.; HEPPER, P. G. The influence of environmental change on the behaviour of sheltered dogs. **Appl Anim Behav Sci**, v. 68, n. 2, p. 151-162, 2000a.

WELLS, D. L.; HEPPER, P. G. Prevalence of behaviour problems reported by owners of dogs purchased from an animal rescue shelter. **Appl Anim Behav Sci**, v. 69, n. 1, p. 55-65, 2000b.

WELLS, D. L.; HEPPER, P. G. The behavior of visitors towards dogs housed in an animal rescue shelter. **Anthrozoos**, v. 14, n. 1, p. 12-18, 2001.

WELLS, D. L. A review of environmental enrichment for kennelled dogs, *Canis familiaris* **Applied Animal Behaviour Science**, v. 85, p. 307-317, 2004.

YAMAMOTO, M.; KIKUSUI, T.; OHTA, M. Influence of delayed timing of owners' actions on the behaviors of their dogs, *Canis familiaris* **Journal of Veterinary Behavior**, v. 4, p. 11-18, 2009.