ANNA CAROLINA BARBOSA ESTEVES MARIA

Estresse em cães durante o banho e tosa: análise de marcadores
biológicos salivares, parâmetros fisiológicos e comportamentais e
fatores ambientais predisponentes

São Paulo

2015

ANNA CAROLINA BARBOSA ESTEVES MARIA

Estresse em cães durante o banho e tosa: análise de marcadores biológicos salivares, parâmetros fisiológicos e comportamentais e fatores ambientais predisponentes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka

São Paulo

2015

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3149
FMVZ

Maria, Anna Carolina Barbosa Esteves

Estresse em cães durante o banho e tosa: análise de marcadores biológicos salivares, parâmetros fisiológicos e comportamentais e fatores ambientais predisponentes / Anna Carolina Barbosa Esteves Maria. -- 2015.
126 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka.

1. Cães. 2. Estresse. 3. Saliva. 4. Cortisol. 5. Cromogranina A. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estresse em cães durante o banho e tosa: análise de marcadores biológicos salivares, parâmetros fisiológicos e comportamentais e fatores ambientais predisponentes", protocolado sob o nº 3068/2013 utilizando 33 (trinta e três) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Paulo César Maiorka, foi aprovado em reunião de 4/9/2013 e 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.

We certify that the Research "Stress in dogs during grooming: analysis of salivary biomarkers, physiological and behavior parameters and predisposing environmental factors", protocol number 3068/2013, utilizing 33 (thirty-three) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Paulo César Maiorka, was approved in the meeting of day 9/4/2013 and 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.

São Paulo, 25 de março de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Maria, Anna Carolina Barbosa Esteves

Título: Estresse em cães durante o banho e tosa: análise de marcadores biológicos salivares, parâmetros fisiológicos e comportamentais e fatores ambientais predisponentes

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada 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:_____

Dedico este trabalho com todo meu carinho e gratidão

À minha mãe Eugênia e minha avó Shirley

A todos os proprietários de cães que perderam seus queridos amigos de forma calamitosa durante o banho e tosa.

"Nós seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Portanto quem chuta ou maltrata um animal é alguém que não aprendeu a amar"

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Cesar Maiorka, por me oferecer grandes oportunidades profissionais, sempre acreditando em meu potencial. Muito obrigada pela paciência e confiança depositada todos esses anos.

Ao meu namorado Victor Suzi que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos difíceis deste doutorado. Agradeço imensamente pelo amor, carinho, companheirismo e principalmente pela grande paciência. Serei eternamente grata!

Agradeço a meu eterno professor e amigo Alexandre Rego que acompanhou de perto o primeiro ano deste doutorado e que, mesmo distante nos outros anos, sempre se fez presente.

A todos os professores do Departamento de Patologia, em especial, a Prof. Dr. Cristina Massoco, pelos trabalhos realizados durante as semanas científicas do departamento, ensinamentos, convivência e conselhos.

À técnica do laboratório de farmacologia Dr. Nicolle Queiroz, por todo o auxílio durante a realização dos testes de ELISA e dos testes estatísticos. Muito obrigada pela grande paciência e pelos ensinamentos.

A todos os funcionários do Departamento de Patologia, em especial, aos que sempre se mostraram muito solícitos e que lembrarei com muito carinho (em ordem alfabética): Adriana, Claudio, Edson, Herculano, Luciana, Luciano (Buga), Milena, Raimundo, Wagner e todos os residentes.

A todos os meus amigos do laboratório de neuropatologia experimental e comparada, em especial para Adriana de Siqueira e Fernanda Salvagni pelo companheirismo, paciência, desabafos e pelos inúmeros momentos de alegria e viagens. Orlando não seria a mesma sem vocês!

À aluna de iniciação científica Júlia Nakamura por ter sido parte integrante da realização deste doutorado. Obrigada por esses dois anos de convivência, aprendizado e muito trabalho.

Aos médicos veterinários Anna Maria Schnabel e Christian Corrêa por acreditarem e confiarem em meu trabalho. Vocês foram as peças mais importantes para a realização deste doutorado, muito obrigada!

A minha grande amiga Paola Branco por toda ajuda, direta e indiretamente, neste último ano de doutorado. Saiba que se hoje tenho esta tese de doutorado, uma parte foi graças a você.

Ao Abrigo Picollina em Avaré/SP, que me atendeu de braços abertos e que foram extremamente importantes para a realização deste trabalho.

Aos médicos veterinários Guilherme Durante e Aline de Mello do laboratório Canis Felis por terem fornecido o espaço para que eu realizasse alguns exames laboratoriais.

À faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e o Departamento de Patologia, pela realização deste doutorado.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

À FAPESP pela concessão do auxílio à pesquisa, processo número: 2013/23645-4.

“Aqueles animais, que com os olhos humildes nos falaram de sua vontade de viver, vítimas solicitadas pela ciência para o benefício da humanidade, o nosso respeito e eterna gratidão.”

Autor desconhecido

RESUMO

MARIA, A. C. B. E. **Estresse em cães durante o banho e tosa:** análise de marcadores biológicos salivares, parâmetros fisiológicos e comportamentais e fatores ambientais predisponentes. [Stress in dogs during grooming: analysis of salivary biomarkers, physiological and behavior parameters and predisposing environmental factors]. 2015. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Os serviços de banho e tosa vem apresentando um grande crescimento, sendo o segundo maior faturamento do mercado *pet* no Brasil. Em um ambiente de banho e tosa, a presença de agentes estressores é inevitável, podendo levar o animal a óbito. Sendo assim, este trabalho visa analisar as alterações nos níveis de cortisol e cromogranina A salivares, as alterações comportamentais e de parâmetros fisiológicos antes e depois do banho e tosa, como também avaliar os fatores ambientais que possam desencadear um quadro de estresse agudo e causar danos à saúde do animal, em 33 cães de dois estabelecimentos de banho e tosa da cidade de São Paulo. A saliva foi coletada por meio de um *swab* introduzido oralmente entre os dentes e a bochecha do cão e posteriormente armazenada a -80°C até a realização dos testes. Para a mensuração dos níveis de cortisol e cromogranina A salivares foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Os resultados apontam que, independente da raça, sexo ou idade, os cães demonstraram aumento dos níveis de cortisol salivar em 61% após o banho e os níveis de cromogranina A salivar aumentaram em 55% antes mesmo do início dos procedimentos. Alguns comportamentos relacionados ao estresse, como rigidez dos membros e lambedura do plano nasal foram observados durante todo o procedimento, porém se intensificaram durante a secagem do pelo, principalmente quando da utilização do soprador. Alguns itens da estrutura do estabelecimento devem ser avaliados periodicamente, tais como secadores, tesouras e escovas, banheiras, mesas de procedimentos e gaiolas, evitando assim quaisquer danos à integridade física do animal. Este estudo demonstra que os procedimentos de banho e tosa geram estresse à grande maioria dos cães e que a estrutura dos estabelecimentos pode apresentar pontos críticos que causem danos à saúde do animal. A presença de um médico veterinário no estabelecimento e o correto treinamento dos funcionários garante uma maior qualidade na prestação dos serviços de banho e tosa,

prevenindo riscos e atuando de forma eficiente e eficaz em quaisquer intercorrências que possam surgir durante o banho e tosa.

Palavras-chave: Cães. Estresse. Saliva. Cortisol. Cromogranina A.

ABSTRACT

MARIA, A. C. B. E. **Stress in dogs during grooming:** analysis of salivary biomarkers, physiological and behavior parameters and predisposing environmental factors. [Estresse em cães durante o banho e tosa: análise de marcadores biológicos salivares, parâmetros fisiológicos e comportamentais e fatores ambientais predisponentes.]. 2015. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Pet grooming is a growing service and the second largest grossing business in Brazil's pet market. In a grooming environment, the presence of stressors is inevitable, and sometimes the stress may lead the animal to death. This study aims to evaluate the acute stress provided in a grooming environment in 33 dogs from two pet shops in Sao Paulo, Brazil, through paired analysis of before and after grooming changes in salivary cortisol and chromogranin A levels, changes in behavioral and physiological parameters and also describe the environmental factors that can trigger an acute stress frame and cause risks to dog's health. The saliva was collected by a swab inserted orally between the dog's teeth and cheek and then frozen at -80 ° C until the tests. Salivary cortisol and chromogranin A levels were measured through immunoenzymatic assays (ELISA). The results show that regardless of breed, gender or age, the dogs increased their cortisol levels by 61% after grooming, while chromogranin A levels increased by 55% even before grooming. Some stress-related behaviors, such as stiffness of the limbs and licking the nasal plane were observed during the entire grooming procedure, but intensified during the drying, especially when the blower was used. To avoid risks to the animals's physical integrity some items in the pet shop structure should be periodically assessed such as dryers, scissors and brushes, baths , procedures tables and cages. This study demonstrated that grooming procedures cause stress in the majority of dogs and that pet shops may present environmental critical points that could be a risk to the animal's health. The presence of a veterinarian and the proper training of employees ensure a higher quality in the grooming services, preventing risks and providing efficient and effective actions through any complications that may arise during grooming procedures.

Keywords: Dogs. Stress. Saliva. Cortisol. Chromogranin A.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	MERCADO PET E OS SERVIÇOS DE BANHO E TOSA.....	17
2.2	COMPORTAMENTO CANINO E INDICADORES DE ESTRESSE	19
2.3	ESTRESSE E SUAS CONSEQUÊNCIAS	21
2.3.1	Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) e Parassimpático (SNAP) e Eixo Simpático-Adrenomedular (SAM).....	24
2.3.1.1	Marcadores biológicos da atividade do eixo SAM	27
2.3.1.2	Cromogranina A e sua relação com o eixo SAM	28
2.3.2	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA).....	30
2.3.2.1	Marcador biológico da atividade do eixo HPA	31
2.4	AS GLÂNDULAS SALIVARES E A SALIVA	32
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	38
4.2	APLICAÇÃO DE QUESTIONÁRIOS	39
4.3	ETAPA 1: COLETA DE MATERIAL E ANÁLISE AMBIENTAL	40
4.3.1	Avaliação dos parâmetros fisiológicos e comportamentais	40
4.3.2	Coleta de saliva	41
4.3.3	Análise ambiental	42
4.4	ETAPA 2: ANÁLISE LABORATORIAL	43
4.5	ETAPA 3: ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
5	RESULTADOS.....	45
5.1	QUESTIONÁRIO ESPECÍFICO	45
5.2	RAÇA, SEXO E IDADE	45
5.3	PARÂMETROS FISIOLÓGICOS PRÉ E PÓS-BANHO.....	47
5.4	VOLUME DE SALIVA COLETADO PRÉ E PÓS-BANHO	50
5.5	CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES PRÉ E PÓS BANHO.....	51

5.6	CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES E OS ESTABELECIMENTOS A E B.....	52
5.7	CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES	54
5.8	CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES E RAÇA	55
5.9	CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES E IDADE	57
5.10	CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES E SEXO	59
5.11	CORRELAÇÃO ENTRE CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES COM OS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS	62
5.12	CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES E FREQUÊNCIA DO BANHO.....	64
5.13	CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES E COMPORTAMENTO (C-BARQ©).....	66
5.14	COMPORTAMENTO DA CHEGADA AO ESTABELECIMENTO E DURANTE OS PROCEDIMENTOS DE BANHO E SECAGEM.....	67
5.15	ANÁLISE AMBIENTAL	68
6	DISCUSSÃO	71
7	CONCLUSÃO	90
7.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICES.....	106
	ANEXO.....	114

1 INTRODUÇÃO

Com um mercado que movimenta mais de 16 bilhões de reais ao ano no país, a indústria do setor *pet* vem crescendo por conta da “humanização” dos animais, que hoje correspondem a uma população de 37 milhões de cães e 21,3 milhões de gatos no país, levando o Brasil a ocupar o segundo lugar do ranking de maior faturamento mundial do ramo, perdendo apenas para os Estados Unidos. Estima-se que nos dias de hoje existam mais de 4,8 mil *pet shops* espalhados na grande São Paulo (ABE, 2015).

Quando o assunto é a higiene dos animais de estimação, os serviços de banho e tosa se destacam, sendo o segundo maior faturamento desse mercado no Brasil, tendo a venda de alimentos em primeiro lugar (ABE, 2015). A procura por estes serviços vem apresentando um rápido crescimento, uma vez que muitos proprietários não dispõem de tempo e habilidade para a realização da higiene de seu animal em domicílio.

Um ambiente de banho e tosa pode parecer um local inofensivo, mas um estudo recente conduzido pela Universidade de São Paulo aponta que até mesmo um animal saudável pode vir à óbito durante tais procedimentos. Esse estudo pioneiro no tema demonstrou que estes animais podem vir a óbito em decorrência de traumas físicos e, principalmente, de estresse (MARIA; REGO; MAIORKA, 2013).

Relatos de banhistas, tosadores, técnicos e médicos veterinários presentes no local destacam a agitação, pânico e agressividade do animal, aumento de sua frequência cardíaca e respiratória, como também perda da consciência por alguns minutos na maioria dos casos. Essas mortes súbitas, que envolvem alterações no comportamento e nos parâmetros fisiológicos cardiorrespiratórios do animal, se assemelham àquelas observadas em um indivíduo que se defronta com um agente estressor, compatível a uma situação de estresse agudo (MARIA; REGO; MAIORKA, 2013).

Semelhante a diversas situações estressoras pelas quais os animais devem passar durante suas vidas, é esperado que o estresse ocasionado pelo procedimento de banho e tosa desencadeie uma série de adaptações fisiológicas para lidar com tal situação. Tais adaptações incluem, por exemplo, alterações no sistema nervoso, nas glândulas adrenais, mudanças comportamentais e nos

parâmetros fisiológicos (BEERDA et al., 1997, 1998; KOOLHAAS et al., 1999a; HORVÁTH et al., 2007; BODNARIU, 2008).

Como forma de identificar o estresse nos animais, a mensuração de marcadores biológicos é amplamente utilizada, apresentando uma gama de substâncias que são liberadas frente tais situações como hormônios, neurotransmissores, proteínas, enzimas, dentre outros (ALLEN et al., 2014).

Diversos materiais biológicos vêm sendo utilizados para detecção de estresse em cães, como amostras de sangue, pelos, fezes, urina e principalmente a saliva, que por ser uma técnica não invasiva, não causa dor e nem estresse ao animal (BEERDA et al., 1996; FARCA et al., 2006; DRESCHER; GRANGER, 2009a; BENNETT; HAYSSEN, 2010).

Em um ambiente de banho e tosa, a presença de agentes estressores é inevitável e considerando essa possibilidade, é essencial o conhecimento de todas as circunstâncias que antecedam e circundam tais procedimentos e que possam levar o animal a um quadro de estresse agudo.

Outro ponto importante que deve ser avaliado tanto por médicos veterinários e funcionários, como também os próprios proprietários dos cães é a estrutura dos estabelecimentos que podem apresentar pontos críticos que causem danos à integridade física dos animais.

Frente ao histórico de óbitos por estresse durante o banho e tosa, este trabalho se propôs a analisar as alterações nos níveis salivares do hormônio cortisol e da proteína cromogranina A - considerados excelentes marcadores biológicos de estresse – as alterações comportamentais e de parâmetros fisiológicos e fatores ambientais que possam desencadear um quadro de estresse agudo em 33 cães de dois estabelecimentos de banho e tosa da cidade de São Paulo, como também analisar os pontos críticos de um estabelecimento que possam causar dano à saúde dos animais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MERCADO PET E OS SERVIÇOS DE BANHO E TOSA

O ramo *pet* no Brasil vem crescendo consideravelmente, como mostra a Abinpet (Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação), sendo que em 2014 houve uma movimentação no mercado de 16.7 bilhões de reais, ficando atrás somente dos Estados Unidos com o maior faturamento mundial do ramo. O valor da receita abrange os segmentos de alimentação, serviços, equipamentos, acessórios e produtos para higiene e medicamentos veterinários. Hoje, o mercado *pet* já representa 0,38% do PIB brasileiro, à frente dos setores de geladeiras e freezers, componentes eletroeletrônicos e produtos de beleza (ABE, 2015).

Ainda segundo a Abinpet, hoje no Brasil há 37,1 milhões de cães, 19,1 milhões de pássaros, 21,3 milhões de gatos, 26,5 milhões de peixes e 2,17 milhões de outros animais, tendo um consumo potencial de 4,11 milhões de toneladas/ano de alimentos (ABE, 2015).

O cenário observado no Brasil é um reflexo da “humanização” dos animais, que além de melhores amigos do homem, também são considerados membros da família como “filhos e irmãos”, fazendo com que esses números subam a cada ano. Em uma pesquisa realizada pelo IBGE (2015), o número de lares brasileiros que possuíam pelo menos um cachorro era de 44,3%.

O número de estabelecimentos, conhecidos popularmente como “pet shops” - que além de comercializarem alimentos, medicamentos e acessórios, também contam com serviços de banho e tosa - vem aumentando a cada ano no país sendo que, somente na cidade de São Paulo, este número chega a mais de 4.800 estabelecimentos (JORDÃO, 2013).

Quando o assunto é a higiene dos animais de estimação, os serviços de banho e tosa se destacam, sendo o segundo maior faturamento desse mercado no Brasil, tendo a venda de alimentos em primeiro lugar (ABE, 2015). A procura por estes serviços vem apresentando um rápido crescimento, uma vez que muitos

proprietários não dispõem de tempo e habilidade para a realização da higiene de seu animal em domicílio.

Por conta desse rápido crescimento de mercado aliado a uma concorrência intensa, podemos deparar com estabelecimentos que não estão de acordo com o proposto pela Resolução nº 878, de 15 de fevereiro de 2008, do Conselho Federal de Medicina Veterinária, que trata da obrigatoriedade da presença de um responsável técnico médico veterinário no estabelecimento de banho e tosa (BRASÍLIA, 2008). Associado a isso, alguns estabelecimentos não apresentam profissionais treinados adequadamente para a realização do banho e tosa do animal, ficando sujeitos a perder clientes se estes acharem que seus animais passaram, desnecessariamente, por uma experiência negativa e até mesmo traumática.

Em 2014, na cidade do Rio de Janeiro, foi sancionada uma Lei 5.811/2014 que dispõe sobre o transporte, manutenção e manejo de animais em *pet shops* que possuem banho e tosa. A Lei exige que o banhista ou tosador deva ser qualificado para a função e ter curso de especialização na área, como também o estabelecimento deve ter acomodações para os animais com espaço, revestimento, ventilação e iluminação adequadas e não pode impedir os movimentos dos animais alojados (RIO DE JANEIRO, 2014).

O estado do Paraná também conta com a Lei 17.949/2014 que obriga os estabelecimentos de banho e tosa a realizarem os procedimentos em locais que possibilitem aos clientes a visão total dos serviços, como também a instalarem câmeras que filmem os procedimentos e que permitam o acompanhamento pelos clientes através da internet (PARANÁ, 2014).

O estado de São Paulo conta apenas com o Decreto n.º 40.400 de 24 de outubro de 1995 que dispõe sobre a instalação de estabelecimentos veterinários. Em seu artigo 18, o decreto trata sobre as condições mínimas para o funcionamento de um estabelecimento de banho e tosa, com sala para banho, sala para tosa e sala para secagem, todas com pisos impermeáveis (SÃO PAULO, 2014).

A pouca regulamentação vigente para os estabelecimentos de banho e tosa pode ser creditada ao fato de que os procedimentos pareçam ser simples e inofensivos, porém um estudo recente conduzido pela Universidade de São Paulo aponta que até mesmo um animal saudável pode vir à óbito durante tais procedimentos. Tal estudo, pioneiro no tema, mostrou que estes animais podem vir

a óbito em decorrência de traumas físicos e, principalmente, de estresse (MARIA; REGO; MAIORKA, 2013)

Um estudo realizado por Medeiros (2007) com cães da raça poodle também mostrou o quão estressante pode ser um procedimento de banho e tosa. Em seu estudo os cães apresentaram aumento nos níveis de cortisol plasmáticos e mudanças comportamentais compatíveis com estresse.

A presença do médico veterinário nos estabelecimentos de banho e tosa é de extrema importância, uma vez que, segundo Maria, Rego e Maiorka (2013), estes animais vem a óbito em poucos minutos. Os autores ainda destacam a importância da avaliação dos parâmetros fisiológicos do animal pelo médico veterinário, antes de qualquer procedimento, seja ele estético ou não, e caso o animal apresente qualquer alteração nesses parâmetros, o proprietário deve ser informado.

2.2 COMPORTAMENTO CANINO E INDICADORES DE ESTRESSE

Há aproximadamente 12.000 anos, em Ein Mallaha, Israel, um humano e um filhote de cão com aproximadamente 3 a 5 meses de idade não imaginariam que seus restos mortais, encontrados juntos em uma posição afetiva, seriam hoje a descoberta arqueológica mais importante da domesticação dos cães (BROCK, 1995; BEAVER, 2001).

Inicialmente, o cão colaborava na caça ajudando o homem a obter a sua presa com maior eficiência e rapidez, mas essa ajuda começou a ir além da caça e os cães começaram a tomar conta do território ao seu redor, ganhando mais um posto, agora o de cão de guarda (BEAVER, 2001).

Milhares de anos se passaram e hoje conhecemos mais de 400 raças de cães, sendo selecionadas pelo homem para diversas funções como trabalho, esporte e companhia. A domesticação levou os cães a se tornarem mais dóceis e tolerantes que os seus antepassados (NOTARI; GOODWIN, 2007). Ainda assim problemas relacionados ao comportamento canino, tais como agressividade, dominância, excitabilidade, entre outros são muito observados.

Em um estudo realizado por Arhant et al. (2010) observou-se que cães de raças pequenas são menos obedientes, mais agressivos, ansiosos, excitados e medrosos em comparação com cães de raças grandes.

A agressividade e agitação também foram observadas no estudo realizado por Maria, Rego e Maiorka (2013) sobre os cães que vieram a óbito durante o banho e tosa. As raças de pequeno porte como Poodle, Lhasa Apso, Shih-tzu e Yorkshire foram as mais acometidas e os médicos veterinários e tosadores presentes no local relatavam tais comportamentos.

Podemos chamar a atenção aos cães das raças Chihuahua e Dachshund que apresentam uma agressividade direcionada a humanos e outros cachorros acima da média (DUFFY; HSU; SERPELL, 2008).

Outro fato interessante foi observado por Podberscek e Serpell (1997) em estudo sobre a agressividade de cães da raça Cocker Spaniel Inglês. Muitos desses cães não eram levados para o banho e tosa por apresentarem um alto grau de agressividade, impossibilitando tais procedimentos.

Em relação ao sexo dos cães, a agressividade é maior nos machos inteiros e nas fêmeas castradas (WRIGHT; NESSELROTE, 1987), além disso fêmeas de raças pequenas também apresentam alto nível de agressividade (GUY et al., 2001).

Quando se trata da ansiedade por separação, o estudo de Wright e Nesselrote (1987) constatou não haver diferenças entre os cães castrados e inteiros, sejam fêmeas ou machos.

O comportamento do cão é um reflexo da atitude do proprietário, principalmente quando da punição, em que há uma forte ligação desta com o medo e agressão. A mudança no modo de punir ou de interagir com os cães de raças pequenas pode melhorar o seu comportamento e sua interação com outros cães e humanos (ARHANT et al., 2010).

O comportamento de um cão pode dizer muito sobre o seu estado em um determinado momento, sendo muito utilizado como um parâmetro indicador de estresse (BEERDA et al., 1997, 1998; BODNARIU, 2008).

Os sinais que demonstram desconforto do animal com alguma situação são amplos, porém os mais observados são vocalização, corpo abaixado, cauda abaixada ou entre as pernas, orelhas abaixadas, tentativa de se esconder, troca de apoio constante entre os membros torácicos, bocejar e tremores (BEERDA et al., 1998; DRESCHER; GRANGER, 2005; BODNARIU, 2008; DÖRING et al., 2009).

Essas mudanças comportamentais frente a um estímulo estressor foram denominadas de *coping styles*. Foram descritos dois *coping styles*, que revelam diferentes níveis de flexibilidade dos indivíduos, o *coping* proativo e *coping* reativo.

O *coping* proativo é caracterizado pela menor flexibilidade, tendência a seguir rotinas, maior impulsividade e agressividade (COPPENS; DE BOER; KOOLHAAS, 2010), além de maior atividade frente ao estímulo estressor (ações como correr, latir, andar de um lado para o outro, atacar com maior rapidez), segundo os estudos de Horváth et al. (2007).

Por outro lado, o *coping* reativo está associado ao medo: indivíduos que ficam, muitas vezes, imóveis, que lambem os lábios, levantam e abaixam as mãos, desviam o olhar, apresentam postura retraída e atacam após um período maior de tempo quando comparados àqueles animais que respondem de acordo com o *coping* proativo (HORVÁTH et al., 2007). Além disso, o *coping* reativo caracteriza indivíduos mais flexíveis, que se sobressaem em ambientes variáveis ou imprevisíveis (KOOLHAAS et al., 1999b).

2.3 ESTRESSE E SUAS CONSEQUÊNCIAS

“Estresse é o estado manifestado por uma síndrome específica que consiste de todas as mudanças inespecíficas induzidas dentro de um sistema biológico”, essas são as palavras de Hans Selye, um endocrinologista que estudou a fundo, pela primeira vez na história da ciência, o estresse em 1936 (SELYE, 1936).

Selye inicialmente começou a estudar o desequilíbrio da homeostase administrando um preparado de hormônios sexuais femininos em ratos para observar se iriam ocorrer alterações que não estivessem ligadas aos hormônios. Os animais apresentaram um aumento considerável do córtex adrenal, atrofia de órgãos linfóides como timo, baço e linfonodos, e úlceras gástricas e duodenais. Mesmo variando a dose de administração dos hormônios, Selye observava as mesmas alterações, com variações apenas na intensidade seguindo a dose administrada (SELYE, 1956)

Após mais alguns estudos, alterando a substância injetada nos ratos, Selye chegou à conclusão de que não importa qual o estímulo danoso, a resposta do

organismo sempre será a mesma, tornando-se uma reação inespecífica. A partir deste momento surgiu a “Síndrome Geral de Adaptação” que é composta por 3 fases, fase de alarme, fase de resistência e fase exaustão (SELYE, 1956).

Fase de alarme: Nesta fase ocorre o reconhecimento da situação estressora pelo sistema nervoso central, tendo como resposta a chamada ação de “luta ou fuga” proposta por Cannon (1929). Inicialmente ocorre a ativação do sistema nervoso autônomo simpático e do eixo simpático adrenomedular (SAM), com subsequente ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), alterando a frequência cardíaca, resistência vascular, secreção de glândulas exócrinas, contração do músculo liso digestivo, entre outros e que perduram por 6 a 48 horas (SELYE, 1936, 1956; MOBERG; MENCH, 2001; GRAEFF, 2007; MCCARTY; PACAK, 2007).

Fase de resistência: Nesta fase, a adrenal apresenta-se aumentada e com vacuolização das células cromafins da camada medular, afetando ainda o crescimento e a reprodução, influenciando os hormônios do crescimento e gonadotrópicos. Com o passar do tempo, se o estímulo estressor for diminuído, o organismo irá sofrer uma adaptação e as suas funções irão retornar à normalidade (SELYE, 1936, 1956; MOBERG; MENCH, 2001; MCCARTY; PACAK, 2007).

Fase de exaustão: Nesta fase o organismo não consegue mais se manter estável e começa a apresentar diversas patologias e caso este estímulo estressor não seja removido a tempo, pode levar ao óbito. Os sintomas presentes nesta fase são similares ao da fase de alarme, porém mais intensos. Nesta fase, por conta da intensa ativação do eixo HPA, ocorrerá uma depleção dos estoques energéticos e o início de doenças características do estresse crônico, como úlceras, hipertensão e anomalias comportamentais. Segundo Selye (1956), esta fase pode iniciar-se em 1 a 3 meses após a fase anterior, sempre levando em conta a severidade do agente estressor (SELYE, 1936, 1956; MOBERG; MENCH, 2001; MCCARTY; PACAK, 2007).

Segundo Selye (1956), quando o estímulo estressor for muito intenso e o indivíduo não tiver como escapar do mesmo, o óbito ocorre já nas primeiras horas, mesmo antes de chegar à fase de resistência.

Após diversos estudos, constatou-se que diferentes tipos de respostas biológicas são utilizadas pelo indivíduo e que a resposta ao mesmo estressor varia

entre diversos indivíduos (CHROUSOS; GOLD, 1992; MOBERG; MENCH, 2001; MCCARTY; PACAK, 2007).

Henry (1992) descreveu duas situações diferentes que demonstram como o organismo responde frente a determinadas situações. A ação de “luta ou fuga” está associada à liberação de adrenalina e noradrenalina com mudanças nos parâmetros energéticos e cardiovasculares. Já na ação de conservação e retirada, ocorre uma ativação da cortical da adrenal com liberação do hormônio cortisol, aumento da atividade vagal por ação do sistema nervoso parassimpático, queda dos esteróides gonadais e elevação crônica da pressão arterial. (STEPTOE, 2007; VALENT, 2007).

A ação de “luta ou fuga” é inicializada quando o animal vê um meio de enfrentar a situação e escapar do estressor, aumentando a sua frequência cardíaca. Já na ação de conservação e retirada, não há uma saída e o animal se vê preso àquele lugar, deixando a tentativa de fuga de lado, mesmo que mais tarde uma via de fuga seja possibilitada este animal não a utilizará, diminuindo assim os batimentos cardíacos e levando alguns animais testados à chamada síncope vasovagal, onde ocorre uma queda brusca da pressão sanguínea arterial e uma inadequada oxigenação cerebral, ocasionando a perda da consciência (HENRY, 1992; KLEIN; CUNNIGHAM, 2008).

Os cães podem apresentar esses dois tipos de respostas dependendo da raça. Estudos realizados com cães de diferentes raças mostram que, a raça Fox terrier frente a um estressor termogênico, irá apresentar uma ação de luta ou fuga, diferentemente do cão da raça Beagle que irá apresentar uma ação de conservação e retirada (BEERDA et al., 1997).

Em uma revisão feita por Graeff (2007), várias literaturas foram discutidas e demonstraram o mesmo pensamento de Henry (1992). Nestes estudos, o pânico e a ansiedade foram confrontados e pode-se perceber que cada emoção ativava um eixo diferente no homem. A ansiedade está presente nas situações em que o perigo é incerto (denominado de ameaça potencial) e o indivíduo impõe uma postura de avaliação frente a este perigo. O pânico acontece quando o indivíduo fica frente a frente com o perigo (denominado ameaça próxima) e inicia uma reação de “luta ou fuga”. Estes estudos demonstraram que a ansiedade ativa tanto o eixo HPA quanto o eixo SAM, já o pânico ativa intensamente o eixo SAM tendo pequeno efeito sobre o eixo HPA.

Diversas pesquisas também demonstram que animais proativos, conhecidos por serem agressivos, ativam principalmente o eixo SAM, enquanto animais reativos, conhecidos por serem animais menos agressivos e mais passivos, ativam principalmente o eixo HPA e a parte parassimpática do sistema nervoso autônomo. Essas características já foram observadas em diversas espécies tais como cão, pássaros, peixes, ratos, suínos, bovinos, macacos e humanos (SGOIFO et al., 1997; KOOLHAAS et al., 1999b; CARERE et al., 2003; ØVERLI et al., 2004; HORVÁTH et al., 2007).

O animal tem que reconhecer que o estressor irá causar danos suficientes a sua homeostase e saber quais defesas usar (MOBERG; MENCH, 2001). Esse reconhecimento varia de acordo com a interpretação individual, a habilidade individual capaz de lidar efetivamente com o estressor, o contexto e status social, fatores genéticos, gênero, e o estágio de desenvolvimento (CHROUSOS; GOLD, 1992; HJEMDAHL, 2007; KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2007; MCEWEN, 2007)

Como mencionado anteriormente, a percepção do organismo à situação ameaçadora irá ativar duas vias essenciais, que irão preparar o organismo para enfrentar o agente estressor, sendo a ativação da parte simpática do sistema nervoso autônomo, responsável pela liberação de catecolaminas na reação de luta ou fuga, e a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), responsável pela liberação de ACTH e glicocorticoides (KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2007; MCCARTY; PACAK, 2007; OTTENWELLER, 2007). Esses eixos e sistemas serão abordados mais detalhadamente a seguir.

2.3.1 Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS) e Parassimpático (SNAP) e Eixo Simpático-Adrenomedular (SAM)

O ramo simpático do sistema nervoso autônomo é formado por fibras pré e pós-ganglionares a partir das porções torácica e lombar da medula espinhal. Este ramo regula as funções relacionadas ao gasto de energia atuando principalmente nas reações de “luta ou fuga” onde uma grande quantidade de energia precisa ser liberada e utilizada para manter a homeostasia (LOVALLO; SOLLERS III, 2007; KLEIN; CUNNIGHAM, 2008).

Com a percepção do estímulo estressor pelo hipotálamo, o sistema nervoso autônomo simpático liberará o neurotransmissor acetilcolina na fenda sináptica através dos neurônios pré-ganglionares colinérgicos. A informação será passada através dos neurônios pós-ganglionares para os terminais nervosos, onde ocorrerá a liberação do neurotransmissor noradrenalina no sítio de atuação. Os neurônios pós-ganglionares que inervam os vasos sanguíneos dos músculos esqueléticos e as glândulas sudoríparas secretam o neurotransmissor acetilcolina no lugar da noradrenalina (GRAEFF, 2007; KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2007; LOVALLO; SOLLERS III, 2007; LUNDBERG, 2007; KLEIN; CUNNIGHAM, 2008).

Em locais onde não há terminações nervosas simpáticas, o hormônio é liberado através da medula adrenal que é estimulada diretamente pela acetilcolina nos neurônios pré-ganglionares colinérgicos dos nervos esplâncnicos vinculados aos receptores colinérgicos nicotínicos nas células cromafins, tornando a adrenal um gânglio simpático especializado. Por seus neurônios não terem axônios, ela libera seus hormônios diretamente na corrente sanguínea. Esta propriedade de lançar os hormônios diretamente na circulação daria – no caso de estresse – a vantagem do acesso rápido a receptores adrenérgicos não inervados por um nervo terminal. A interação entre o sistema nervoso simpático e a medula da adrenal chamamos de eixo SAM (GREENSPAN, 2006; GRAEFF, 2007; KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2007; LOVALLO; SOLLERS III, 2007; KLEIN; CUNNIGHAM, 2008).

A adrenalina é o principal hormônio produzido pela medula adrenal, seguido pela noradrenalina que além de neurotransmissor atua também como hormônio. A maior parte da noradrenalina se encontra nas vesículas sinápticas adrenérgicas dos neurônios pós-ganglionares, portanto, na medula adrenal apenas observa-se sua produção em 30% no cão e 40% no gato (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; GREENSPAN, 2006; KVETNANSKY; MCCARTY, 2007).

Após a sua liberação, as catecolaminas se ligam a receptores adrenérgicos para produzirem o efeito desejado. Esses receptores adrenérgicos são divididos em 2 grupos, receptores α -adrenérgicos (α_1 e α_2) e β -adrenérgicos (β_1 , β_2 e β_3). A ação dos receptores α_1 no organismo se concentra na contração do músculo liso vascular e de outros músculos lisos, já os α_2 atuam sobre o metabolismo da insulina e do glucagon no pâncreas, inibindo a liberação das mesmas. Dentre os receptores β -adrenérgicos, o β_1 tem a sua maior ação sobre o músculo cardíaco, aumentando a frequência, o débito, e a força de contração cardíaca, já o β_2 faz o papel contrário ao

receptor α_1 , relaxando a musculatura lisa e esquelética; no caso do receptor β_3 , sua ação também é metabólica e atua estimulando a lipólise. Essas ações irão preparar o organismo para enfrentar os possíveis danos que o estímulo estressor possa acarretar (GOLDSTEIN, 2007; KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2007; KVETNANSKY; MCCARTY, 2007; OTTENWELLER, 2007; STABENFELDT; GRECO, 2008).

A adrenalina se liga aos dois grupos de receptores, mas tem maior afinidade pelos receptores β -adrenérgicos onde causa vasodilatação da musculatura lisa e esquelética. Já a noradrenalina tem uma maior afinidade pelos receptores α -adrenérgicos causando vasoconstricção da musculatura lisa. Por conta de ambas as catecolaminas estimularem o mesmo receptor α -adrenérgico, algumas ações da noradrenalina são duplicadas pela ação da adrenalina (EILER, 2004; KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2007; POLLARD, 2007; STABENFELDT; GRECO, 2008).

Episódios prévios de estresse exercem um maior controle sobre a secreção de catecolaminas pela medula da adrenal nas próximas exposições ao estressor, diminuindo assim seus níveis circulantes, mas quando este estressor torna-se diferente, os níveis de catecolaminas podem aumentar abruptamente. Isto demonstra que, animais expostos cronicamente ao mesmo estressor encontram-se em uma escala de habituação, e quando estes se deparam com um novo estressor, se tornam sensibilizados (KVETNANSKY; MCCARTY, 2007; MCCARTY; PACAK, 2007; OTTENWELLER, 2007).

Outro ramo que faz parte do sistema nervoso autônomo juntamente ao ramo simpático é o parassimpático. Este ramo é composto por fibras pré-ganglionares que partem de regiões distintas do ramo simpático, a partir dos nervos craniais e do segmento sacral. Neste ramo, tanto as fibras pré-ganglionares como as pós-ganglionares utilizam o neurotransmissor acetilcolina, com exceção das fibras pós-ganglionares do trato digestivo que utilizam a adenosina trifosfato como seu transmissor (LOVALLO; SOLLERS III, 2007; STEPHENSON, 2008).

Ao contrário do ramo simpático, este ramo atua sobre a conservação de energia em momentos como a alimentação, digestão, reprodução, e principalmente no coração controlando a frequência cardíaca e a pressão vascular, tornando o nervo vago mais importante que os nervos simpáticos quando o assunto é a manutenção da frequência cardíaca. Em situações de estresse, a ativação exacerbada do SNAS acaba por diminuir drasticamente a ação do parassimpático (JENNINGS, 2007; LOVALLO; SOLLERS III, 2007; STEPHENSON, 2008).

Quando a acetilcolina é liberada pelos neurônios pós-ganglionares, irá atuar em órgãos que apresente os receptores colinérgicos muscarínicos. O sistema cardiovascular apresenta grande quantidade de receptores colinérgicos muscarínicos, principalmente os receptores M_2 e M_3 . No coração, a principal função parassimpática é a de reduzir a frequência e o débito cardíaco. Já nas arteríolas, podemos destacar o aumento do fluxo coronariano, e o aumento do fluxo sanguíneo muscular esquelético antes da realização de exercícios (STEPHENSON, 2008).

Quando há um grande aumento na pressão arterial ocorre uma estimulação dos barorreceptores que ali se encontram, que enviam um sinal através das fibras aferentes para o tronco cerebral. No tronco cerebral irá ocorrer uma inibição de seus centros simpáticos e uma estimulação de seus centros parassimpáticos. Esta ação dos barorreceptores age como um “feedback” negativo nos centros simpáticos frente ao aumento na pressão, promovendo a diminuição da frequência cardíaca e a pressão arterial (PARATI et al., 2007; STEPHENSON, 2008).

2.3.1.1 Marcadores biológicos da atividade do eixo SAM

A mensuração de catecolaminas em animais e humanos é comumente realizada através de testes de urina, já que por terem uma meia vida de poucos minutos, são rapidamente eliminadas da corrente sanguínea, impossibilitando sua mensuração através do plasma (BEERDA et al., 1996; PEASTON; WEINKOVE, 2004; EL-BAHR et al., 2005; LUCOT et al., 2005; PALME et al., 2005). Em um estudo realizado por El-Bahr et al. (2005), observou-se a presença de um metabólito das catecolaminas nas fezes de animais, denominado ácido vanil-mandélico, porém a quantidade não é suficiente para uma análise quantitativa.

O uso das catecolaminas como marcadores biológicos de estresse agudo não é muito viável frente à rápida eliminação da corrente sanguínea, como também por conta do estresse na manipulação do animal, o que também é válido para amostras de urina. Para se minimizar o estresse da manipulação, a coleta de amostras a partir da saliva vem sendo muito utilizada em humanos, principalmente crianças e em animais, porém os níveis de catecolaminas observados nessas amostras são

extremamente baixos e não apresentam correlação com seus níveis plasmáticos (HOUPPT et al., 1988; SCHWAB; HEUBEL; BARTELS, 1992; KENNEDY et al., 2001).

Frente à impossibilidade de se obter um resultado confiável com as catecolaminas salivares, pesquisadores começaram a mensurar na saliva a enzima α -amilase, que tem como principal função a digestão do amido ainda na boca. Diversas pesquisas apontaram que a α -amilase salivar tem uma grande correlação com o estresse agudo, uma vez que é secretada quando da estimulação do eixo SAM (KOH; NG; NAING, 2014; WIEMERS; SCHULTHEISS; WOLF, 2015).

A utilização da enzima α -amilase salivar para detecção de estresse agudo em cães se torna inviável, uma vez que estes produzem uma quantidade ínfima da enzima em suas glândulas salivares (CHAUNCEY; HENRIQUES; TANZER, 1963; MOCHARLA; MOCHARLA; HODES, 1990).

Como opção para a mensuração de estresse agudo através da saliva, cientistas começaram a optar por utilizar a cromogranina A, uma vez que é uma proteína que se mantém estável tanto no sangue como na saliva e reflete a ação do SNAS.

2.3.1.2 Cromogranina A e sua relação com o eixo SAM

A cromogranina A é uma proteína ácida e hidrossolúvel encontrada principalmente nas células cromafins da região medular da adrenal, liberada juntamente com a adrenalina e noradrenalina. Podemos encontra-la também nos grânulos secretórios de diversos tecidos neuroendócrinos como hipófise, paratireoide, tireoide, ilhotas pancreáticas, trato gastrointestinal, nervos simpáticos e cérebro, como também em tumores neuroendócrinos (SOMOGYI et al., 1984; DOSS et al., 1998; SATO et al., 2002; CRONIN et al., 2003; SARUTA et al., 2005; KANAI et al., 2008; STRIDSBERG et al., 2014).

Sua função ainda não está completamente elucidada, mas pesquisas indicam que a proteína está associada ao envelopamento de hormônios, estabilização granular contra o aumento da pressão osmótica e excreção de cálcio intracelular (RINDI et al., 1986; PARMER et al., 1993).

Por ser liberada juntamente com a adrenalina e noradrenalina, através da ativação do eixo SAM, a cromogranina A vem sendo muito utilizada como um marcador biológico de estresse em humanos e em diversos animais por ser mais estável no sangue que as catecolaminas (KANNO et al., 1999; AKIYOSHI et al., 2005; MIYAKAWA et al., 2006; XAVIER, 2008; KOZAKI et al., 2009; GALLINA et al., 2011; ESCRIBANO et al., 2014; OTT et al., 2014; STRIDSBERG et al., 2014).

Durante uma situação de estresse, cromogranina A e noradrenalina plasmáticas aumentam simultaneamente, fortalecendo ainda mais a tese de que a cromogranina A pode ser utilizada como marcador biológico de estresse agudo (SATO et al., 2002).

Estudos demonstram que a cromogranina A, apesar de também ser liberada frente a estressores físicos, é mais intensamente liberada frente a estressores psicológicos como falar em público, provas acadêmicas e dirigir um automóvel (NAKANE et al., 2002; TAKATSUJI et al., 2008).

A mensuração da cromogranina A na saliva vem sendo muito utilizada, pois minimiza o estresse que por ventura possa surgir durante a coleta de sangue, principalmente em animais (KANNO et al., 1999; SATO et al., 2002; KANAI et al., 2008; ESCRIBANO et al., 2013, 2014; OTT et al., 2014).

Além dos locais de produção citados anteriormente, a cromogranina A também é produzida nos ácinos serosos das glândulas salivares, conforme estudos realizados em humanos, ratos e cavalos (KANNO et al., 1999; SATO et al., 2002; SARUTA et al., 2005).

Pouco se sabe sobre a presença de cromogranina A na saliva de cães. Um estudo realizado por Kanai et al. (2008) mensurou a cromogranina A em saliva de cães e demonstrou que esta não sofre variação circadiana e que também não há diferenças nos níveis entre machos e fêmeas, fato também observado por Escribano et al. (2014) em seu trabalho com suínos.

O uso de testes biológicos para pesquisa da cromogranina A em humanos se mostrou viável para a utilização em cães, uma vez que a cromogranina A canina apresenta imunologicamente uma reação cruzada com a de humanos (KANAI et al., 2008; STRIDSBERG et al., 2014).

2.3.2 Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)

A percepção do estímulo estressor pelo hipotálamo irá ativar a produção do hormônio liberador de corticotropina (CRH) que irá atuar na *pars distalis* da pituitária fazendo com que a mesma libere o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) estimulando o córtex da adrenal à produção e liberação de glicocorticóides na circulação (DICKERSON; KEMENY, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; GRAEFF, 2007; KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2007; OTTENWELLER, 2007; WATTS, 2007; STABENFELDT; GRECO, 2008).

Com a liberação dos glicocorticóides na circulação, vários parâmetros fisiológicos serão alterados e uma grande quantidade de energia será produzida e utilizada, como uma promoção da gliconeogênese e glicogenólise, redução do consumo de glicose pelos tecidos, lipólise, mobilização de ácidos graxos livres de depósitos de gordura, entre outros. As principais alterações fisiológicas ocorrem no sistema cardiovascular, onde haverá um aumento da sua função, em parte já sensibilizada pelas catecolaminas, no sistema imune onde ocorrerá um efeito anti-inflamatório e antialérgico, irá regular o volume sanguíneo e responder a hemorragia atuando sobre a vasopressina, acarretará efeito significativo em processos cognitivos e afetivos, e irá suprimir o aumento nos níveis de noradrenalina no SNC que são dependentes do estresse (DICKERSON; KEMENY, 2004; KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2007; MUNCK, 2007; STABENFELDT; GRECO, 2008).

Após a liberação dos glicocorticóides na corrente sanguínea, estes poderão se ligar a dois tipos de receptores, os receptores de glicocorticóides (GRs) e os receptores de mineralocorticóides (MRs). Os GRs estão presentes nos tecidos periféricos e irão promover as ações clássicas dos glicocorticóides, atuando sobre as reservas de energias e nas respostas inflamatórias e imunes. Os MRs apesar de serem receptores para mineralocorticóides encontrados nas células epiteliais dos rins e cólon, também se ligam aos glicocorticóides, porém, uma enzima denominada 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase atua sobre os MRs impedindo a sua ligação com os glicocorticóides, deixando esses receptores livres para a atuação da aldosterona (MEIJER; KLOET; MCEWEN, 2007; MUNCK, 2007).

2.3.2.1 Marcador biológico da atividade do eixo HPA

Como descrito anteriormente, a ativação do eixo HPA irá fazer com que o córtex da adrenal libere glicocorticóides, tendo o cortisol como seu principal produto, sendo este utilizado como marcador biológico para as situações de estresse em humanos e animais como cães, gatos, suínos, equinos, peixes, mamíferos aquáticos, roedores, dentre outras espécies (BERTOLONI et al., 2006; BRANDÃO; GOMES; CHAGAS, 2006; NETO et al., 2006; TEIXEIRA; PADUA, 2006; CARMO et al., 2013; GONG et al., 2015).

O uso do cortisol para detecção de estresse em cães vem sendo utilizado amplamente, já tendo sido mensurado através de amostras de sangue, saliva, pelo, fezes e urina (FARCA et al., 2006; BENNETT; HAYSEN, 2010; BRYAN et al., 2013; ZEUGSWETTER et al., 2013; GALEANDRO et al., 2014)

Diversas pesquisas já foram realizadas com o intuito de se conhecer melhor como esse hormônio se comporta no organismo do cão, como se há variação circadiana e diferenças entre raça, sexo e idade.

Os estudos acerca da variação circadiana continuam sendo feitos até os dias de hoje. Sabe-se que em humanos os níveis de cortisol começam a aumentar durante a madrugada e atingem seu pico no início da manhã (KIM; JEONG; HONG, 2015). Espécies como equinos, suínos, bovinos, ovelhas, macacos rhesus e camundongos também apresentam influencia circadiana nos níveis de cortisol (FULKERSON; TANG, 1979; THUN et al., 1981; QUABBE et al., 1982; IRVINE; ALEXANDER, 1994; KOOPMANS et al., 2005; GONG et al., 2015).

A influência circadiana e sazonal nos níveis de cortisol nos cães está ausente, assim como diferenças entre raça, sexo e idade, o que facilita a realização de pesquisas com esses animais (JOHNSTON; MATHER, 1978; MURASE; INABA; MAEDE, 1988; THUN; EGGENBERGER; ZEROBIN, 1990; KOYAMA; OMATA; SAITO, 2003; HORVÁTH et al., 2007). Apenas um estudo realizado por Palazzolo e Quadri (1987) observou variação circadiana em cães adultos e a ausência em cães jovens e idosos.

Por não apresentar essas variações e diferenças entre os cães e de poder ser mensurado através de diversas amostras, o cortisol é o melhor marcador biológico de estresse, porém devemos ter em mente que a manipulação durante a coleta

poder interferir em seus níveis (BEERDA et al., 1998; KOBELT et al., 2003; KOYAMA; OMATA; SAITO, 2003; DRESCHER; GRANGER, 2009b). Um estudo realizado por Hennessy et al. (1998) mostrou que os níveis de cortisol plasmático apresentavam-se elevados 20 minutos após a manipulação e punção venosa para a retirada do sangue.

Para minimizar a interferência da coleta nos níveis de cortisol, o uso da saliva vem se demonstrando uma excelente escolha, já tendo sido utilizado em diversas espécies como cães, cavalos, suínos, golfinhos, macacos, onças e elefantes (RUIS et al., 1997; LUTZ et al., 2000; KOYAMA; OMATA; SAITO, 2003; PEDERNERA-ROMANO et al., 2006; BERGAMASCO et al., 2010; MENARGUES et al., 2012; AURICH et al., 2015).

Em estudo realizado por Kobelt et al. (2003) observou-se que o aumento nos níveis plasmáticos de cortisol só irá se refletir na saliva após 4 minutos, dando uma margem maior para a coleta da saliva sem que a manipulação reflita nos resultados.

Os níveis de cortisol observados na saliva refletem a fração livre do hormônio no plasma e não sofrem interferências do fluxo salivar, pois suas moléculas são pequenas e de alta solubilidade, facilitando sua difusão através das membranas das células secretoras, ou seja, tanto em uma saliva mais fluída ou mais mucosa, a quantidade do hormônio será a mesma (PARROTT; MISSON; BALDWIN, 1989; AMENÁBAR, 2006).

2.4 AS GLÂNDULAS SALIVARES E A SALIVA

A glândula salivar é constituída por ácinos que secretam água, eletrólitos, enzimas e mucos, mantendo o interior da boca úmido, facilitando a mastigação e lubrificando a passagem do bolo alimentar em direção ao esôfago, contando ainda com sua ação antibacteriana, termorreguladora e reguladora de pH (DYCE; SACK; WENSING, 1996; HERDT, 2008; SJAASTAD; SAND; HOVE, 2010).

No cão, assim como na maioria dos mamíferos, temos a presença de pelo menos três tipos de pares glandulares: glândula parótida, glândula mandibular e glândula sublingual. Cada glândula produz um tipo de secreção que quando unidas formam a saliva (DYCE; SACK; WENSING, 1996; HERDT, 2008).

A glândula parótida está localizada sob a orelha e atrás do ramo vertical da mandíbula, tendo o formato de “Y” no cão (DYCE; SACK; WENSING, 1996; HERDT, 2008). Suas células acinares produzem uma secreção serosa em uma quantidade média de 0,55ml/min (CHAUNCEY; HENRIQUES; TANZER, 1963).

A glândula mandibular está localizada no espaço intermandibular, bem abaixo da glândula parótida, sendo menor que esta, apresentando formato ovóide (DYCE; SACK; WENSING, 1996; HERDT, 2008). Suas células acinares produzem uma secreção mista mucosa e serosa em uma quantidade média de 1,31ml/min (CHAUNCEY; HENRIQUES; TANZER, 1963).

A glândula sublingual está localizada na base da língua, rostral a glândula mandibular, apresentando formato alongado. Suas células acinares produzem uma secreção mista mucosa e serosa (DYCE; SACK; WENSING, 1996; HERDT, 2008).

A saliva consiste em mais de 98% de água, tendo ainda a presença de eletrólitos, hormônios, proteínas, enzimas, anticorpos, componentes antimicrobianos, citocinas e outros compostos orgânicos (DE ALMEIDA et al., 2008; SJAASTAD; SAND; HOVE, 2010; MALATHI; MYTHILI; VASANTHI, 2014). Por ser composta em quase sua totalidade de água, o principal fator que interfere na secreção salivar é o grau de hidratação do indivíduo (DE ALMEIDA et al., 2008).

Os componentes presentes na saliva são produzidos principalmente por suas células acinares, que são permeáveis à água e formam um fluído isotônico em relação ao sangue. Ao saírem dessas células, o fluído segue um caminho através dos ductos e passa a ser tornar hipotônico (CASTLE; CASTLE, 1998; HUMPHREY; WILLIAMSON, 2001).

O fluxo salivar é controlado unicamente pelo sistema nervoso autônomo parassimpático (SNAP) e simpático (SNAS), que estimulam as células salivares através de receptores colinérgicos e β -adrenérgicos, respectivamente. Quando da estimulação do SNAP ocorre uma vasodilatação e consequente aumento do fluxo salivar, tornando a saliva mais aquosa. Já na estimulação do SNAS ocorre uma vasoconstrição com consequente diminuição no fluxo salivar e aumento na produção de proteína, deixando a saliva mais viscosa (DYCE; SACK; WENSING, 1996; HERDT, 2008; SHORT; PRATT; VASS, 2013).

A nível celular, a acetilcolina (neurotransmissor do SNAPS) juntamente com a substância P (neuropeptídeo que regula diversas funções biológicas) se ligam a receptores cognatos e causam uma elevação intracelular de cálcio resultando em

um transporte altamente fluído e rico em eletrólitos, em contrapartida levam a uma baixa exocitose das proteínas estocadas (CASTLE; CASTLE, 1998).

Já quando os receptores β -adrenérgicos são ativados elevam os níveis intracelulares de AMP cíclico, que dentre muitas funções ativa a síntese proteica, aumentando a secreção das proteínas salivares que ficam estocadas nos grânulos secretórios (CASTLE; CASTLE, 1998).

Um estudo realizado com glândulas parótidas de ratos observou que a ativação simpática desta glândula libera todo o seu conteúdo estocado nos grânulos em duas horas, retornando ao seu estágio inicial apenas 16 horas após o estímulo simpático (AMSTERDAM; OHAD; SCHRAMM, 1969). Um estudo semelhante foi realizado com glândulas parótidas de coelhos e se observou que a duração entre o início da síntese proteica na glândula e a sua liberação era de pouco mais de duas horas (CASTLE; JAMIESON; PALADE, 1972). Não foi encontrada literatura a cerca do assunto em cães.

Quando os cães sofrem uma excitação nos nervos simpáticos que inervam a glândula parótida, observa-se a ausência de secreção proveniente desta glândula, enquanto que a glândula submandibular apresenta uma secreção moderada e a sublingual uma secreção discreta (EMMELIN; YOUNG; GARRETT, 1981). Em média, um cão de 20 kg produz 500 ml de saliva por dia (SJAASTAD; SAND; HOVE, 2010).

O estudo pioneiro sobre o fluxo salivar e sua estimulação em cães foi realizado por Pavlov em 1890. Neste estudo o pesquisador observou que os cães começavam a salivar apenas observando o alimento, ou até mesmo ouvindo um sino que era tocado antes de serem alimentados (WARFORD; MADGWICK, 2014)

Durante o seu estudo, Pavlov percebeu que a salivação do cão frente à presença de alimento era uma resposta não condicionada, ou seja, uma resposta a um estímulo que não precisava ser aprendida. Quando ele começou a associar um sino ao alimento, após muitos testes o cão já apresentava salivação só de ouvir o som do sino, sem a presença de comida, tornando-se uma resposta condicionada, ou seja, aprendida (WARFORD; MADGWICK, 2014).

Independente da resposta ao estímulo ser ou não condicionada, podemos afirmar que os cães salivam com a presença, cheiro ou associação a um alimento. Quando um alimento seco é dado a um cão a saliva apresenta uma secreção mais

serosa, em contrapartida de quando se é dado um alimento úmido, em que a secreção salivar é mais mucosa (WARFORD; MADGWICK, 2014).

A facilidade do cão em salivar frente a estímulos, conforme observado no estudo de Pavlov, faz da saliva um excelente material biológico para a realização de testes laboratoriais. Coletada por meio de uma técnica não invasiva, a saliva pode ser utilizada quando da incapacidade de se coletar urina ou sangue (SHIRTCLIFF et al., 2001; MALAMUD, 2011; MALATHI; MYTHILI; VASANTHI, 2014).

Existem diversas técnicas de coleta salivar, desde a passiva até a utilização de swabs de algodão e filtros de papel. Cada analito deve ser coletado de acordo com sua técnica ideal, pois do contrário pode haver interferências nos valores finais (SHIRTCLIFF et al., 2001; SALIMETRICS, 2013; OYAMA et al., 2014).

A coleta de saliva vem sendo muito utilizada em animais, que por ser uma técnica não invasiva, não causa dor e nem estresse ao animal. Podem-se citar, como exemplo, as coletas já realizadas em macacos, suínos, rinocerontes, mamíferos aquáticos, roedores e principalmente cães (BENARDE et al., 1956; LUTZ et al., 2000; MILLSPAUGH et al., 2002; GÓMEZ et al., 2004; DRESCHER; GRANGER, 2009b; GUTIÉRREZ et al., 2009; TRIGGS, 2013).

A coleta de saliva em cães pode ser feita por meio do swab de algodão, esponjas de hidrocélulose (DRESCHER; GRANGER, 2009b) e filtros de papel (OYAMA et al., 2014). A utilização de flavorizante e ácido cítrico nos swabs pode ajudar o animal a produzir mais saliva, porém pode interferir nos valores finais das análises, uma vez que produtos de origem animal e vegetal podem apresentar reação cruzada com os anticorpos dos testes imunológicos (DRESCHER; GRANGER, 2005, 2009b).

Muitos pesquisadores já fazem o uso da saliva para mensurar marcadores de estresse em cães, como o cortisol e imunoglobulinas, devido ao fato de gerar menos estresse ao animal que a coleta de sangue (BEERDA et al., 1996, 1997, 1998; DRESCHER; GRANGER, 2005, 2009b; COPPOLA; GRANDIN; ENNS, 2006).

O uso da saliva como material biológico em cães tem atingido grandes patamares sendo já utilizada em pesquisa com genoma. Pesquisadores perceberam que o DNA presente na saliva dos cães apresentava a mesma qualidade daquele extraído do sangue e sugerem uma maior utilização desta técnica, tendo em vista a rapidez e conveniência de sua coleta (YOKOYAMA; ERDMAN; HAMILTON, 2010).

Diante disso é notório que o uso da saliva como fonte de material biológico para fins de diagnóstico apresenta resultados confiáveis e promissores, além de proporcionar ao animal menor manipulação e consequente estresse.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se os procedimentos em estabelecimentos de banho e tosa são potenciais agentes estressores para cães, como também os riscos que a estrutura dos estabelecimentos possam oferecer à saúde dos animais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os níveis de cortisol salivar em cães, pré e pós-procedimentos de banho e tosa, através de ensaio imunoenzimático (ELISA).

Avaliar os níveis de cromogranina A salivar em cães, pré e pós-procedimentos de banho e tosa, através de ensaio imunoenzimático (ELISA).

Comparar os níveis de cortisol e cromogranina A salivares observados nos cães submetidos ao banho e tosa com os níveis basais e frente a outros estressores descritos em literatura.

Avaliar a idade, sexo e raça dos cães submetidos aos procedimentos de banho e tosa e correlacioná-los com os níveis de cortisol e cromogranina A salivares.

Avaliar os parâmetros fisiológicos de cães, pré e pós-procedimentos de banho e tosa e correlacioná-los com os níveis de cortisol e cromogranina A salivares.

Avaliar o comportamento dos cães, pré, trans e pós-procedimentos de banho e tosa e correlacioná-los com as etapas do processo de banho e tosa.

Correlacionar o comportamento dos cães fora do ambiente de banho e tosa com os níveis de cortisol e cromogranina A salivares observados no banho e tosa.

Apontar os pontos críticos em um estabelecimento de banho e tosa e analisar os potenciais riscos para a integridade física do animal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução deste trabalho foram utilizados 33 cães de diferentes raças, sexo e idade, submetidos ao procedimento de banho e tosa em dois estabelecimentos da cidade de São Paulo, entre agosto de 2013 e outubro de 2014; no estabelecimento A foram utilizados 14 cães e no estabelecimento B, 19 cães.

Os animais foram identificados através de numeração arábica, seguindo a ordem das coletas, começando pelo número 1, independente de raça, sexo, idade e estabelecimento. Animais que apresentavam alguma doença endócrina informada pelo médico veterinário do estabelecimento ou pelo proprietário do animal, foram retirados da amostragem do trabalho.

O presente trabalho é composto de análises quantitativas e qualitativas e foi dividido em três etapas:

Etapa 1 - Coleta de material e análise ambiental;

Etapa 2 - Análise laboratorial;

Etapa 3 - Análise estatística.

Na etapa 1 foram realizadas a avaliação dos parâmetros fisiológicos, comportamentais e coleta de saliva antes e após os procedimentos de banho e tosa. Na etapa 2 foram realizadas as análises dos analitos salivares cortisol e cromogranina A através de um ensaio imunoenzimático (ELISA). Na etapa número 3 foram realizadas as análises estatísticas utilizando o programa GraphPad Prism 6.

4.1 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Para que os animais pudessem ser utilizados no projeto, foi entregue ao proprietário do animal um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A). Neste termo constavam todos os detalhes do procedimento que o animal seria submetido, os dados do animal, como também do pesquisador e do proprietário, sendo assinado, ao final, por ambos. A participação no projeto foi voluntária, sem compensação financeira, podendo o proprietário deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo.

4.2 APLICAÇÃO DE QUESTIONÁRIOS

Dois questionários foram aplicados aos proprietários para obtenção de informações a respeito da saúde do animal, visitas ao *pet shop* e de seu comportamento em casa.

O primeiro questionário (Apêndice B) com 08 perguntas se refere ao histórico do animal em *pet shops*, abordando, por exemplo, questões acerca da idade ao primeiro procedimento, frequência com a qual o cão é levado ao *pet shop*, eventuais episódios de agressão a funcionários ou lesões observadas no animal após o banho e tosa.

Além desse questionário específico, cada proprietário recebeu o questionário C-BARQ© (*Canine Behavioral Assessment & Research Questionnaire*) (Anexo A) desenvolvido e validado por pesquisadores do *Center for the Interaction of Animals and Society* da Universidade da Pensilvânia. Com o intuito de reduzir a subjetividade e generalização, todos os itens do questionário foram redigidos para abordar respostas típicas dos cães a situações e eventos específicos (HSU; SERPELL, 2003). O C-BARQ© sofreu adaptações neste estudo, incluindo a tradução e a remoção da última categoria (“Miscelânea”), devido ao maior grau de subjetividade reconhecido pelos próprios idealizadores.

Sendo assim, o C-BARQ© adaptado consiste em seis sessões: 1- Treinamento e Obediência; 2- Agressão; 3- Medo e Ansiedade; 4- Comportamento associado à separação; 5- Excitabilidade; 6- Apego e busca por atenção. Em cada sessão, o responsável pelo cão indica a resposta mais provável do animal à determinada situação, usando escalas que variam de acordo com a sessão.

A interpretação do questionário foi feita pelo sistema C-BARQ© Online. A avaliação do cão é dividida em subescalas e, para cada subescala, dá-se uma nota, a qual é comparada à média dos cães da mesma raça e à média geral do banco de dados, classificando os animais em percentis.

4.3 ETAPA 1: COLETA DE MATERIAL E ANÁLISE AMBIENTAL

O quadro 1 a seguir mostra as ações (avaliação comportamental, avaliação dos parâmetros fisiológicos e coleta de saliva) realizadas em cada etapa do banho e, eventualmente, tosa, denominada de pontos de checagem.

Quadro 1 - Ações realizadas em cada ponto de checagem

Pontos de checagem	Comportamento	Parâmetros Fisiológicos	Coleta De Saliva
1: chegada do animal ao estabelecimento	X		
2: exame físico pré-banho	X	X	X
3: entrada no recinto de banho e tosa	X		
4: durante o banho e secagem	X		
5: após o banho	X	*X	*X
6: após a tosa	X	X	X

Fonte: (MARIA, A. C. B. E., 2015)

*A coleta de saliva e a avaliação dos parâmetros fisiológicos só foram realizadas caso o animal não necessitasse de tosa, seja ela completa ou higiênica. Quando houve tais procedimentos após o banho, as avaliações dos parâmetros fisiológicos e a coleta de saliva foram realizadas apenas ao final da tosa.

A duração do procedimento completo, desde o início do banho até a entrega do animal ao dono, variou entre 25 minutos a 1 hora e 15 minutos, com uma média de 45 minutos. A variação no tempo é devido à quantidade de pelo presente no animal, o que demanda mais tempo na hora da secagem, como também se o procedimento envolve tosa completa ou higiênica.

4.3.1 Avaliação dos parâmetros fisiológicos e comportamentais

Foi elaborada uma ficha individual (Apêndice C) contendo os itens a serem respondidos em relação aos parâmetros fisiológicos e comportamentais do animal.

A avaliação comportamental foi feita através do método de observação estruturada, dividida em pontos de checagem, contendo o horário de início de cada etapa e questões abertas e fechadas, podendo ser incluídas outras informações que se fizessem necessárias.

Na avaliação dos parâmetros fisiológicos pré e pós-banho, os meios semiológicos utilizados foram: mensuração das frequências cardíacas e respiratórias por minuto, utilizando-se um estetoscópio; inspeção direta dos movimentos respiratórios (quando a auscultação pulmonar tornava-se prejudicada) e das mucosas ocular, jugal e gengival; palpação direta da mucosa gengival, quando possível, para avaliação do Tempo de Preenchimento Capilar (TPC); por fim, para a aferição da temperatura retal, utilizou-se termômetro digital.

4.3.2 Coleta de saliva

Para a coleta da saliva, alimentos como ração úmida, salsicha e biscoitos foram colocados próximos à narina do animal por 15 segundos, para estimular a produção de saliva. Após, um algodão específico para coleta de saliva (Salimetrics Children's Swab (SCS)) foi introduzido na boca do animal, entre os dentes e a bochecha, até atingir o volume necessário de saliva para a realização dos testes (mínimo de 500µl), podendo o animal mastigar o swab. Após o uso, o algodão foi colocado dentro de uma seringa plástica de 3 ml para a extração da saliva e verificação imediata do volume coletado.

Devido ao fato que os níveis de cortisol se encontram aumentados na saliva 5 minutos após a manipulação do animal, teve-se o cuidado para que esta manipulação não causasse muito estresse e interferisse nos níveis de cortisol, portanto muitos animais não atingiram a quantidade de 500µl de saliva, principalmente pós-banho. Ao atingir o tempo aproximado de 5 minutos, a coleta de saliva era interrompida.

O volume final de saliva foi alicotado em volumes de 80 µl para cortisol, 30 µl para cromogranina A e o restante em alíquotas de 100 µl, e armazenados em microtubos de 0,6ml, imediatamente congelados a -25°C em um cooler elétrico (E-Cooler Max Cold – EasyPath) e ao final do dia armazenados em um freezer -80°C,

impedindo assim a sua degradação (SALIMETRICS, 2013). Como as análises foram realizadas em duplicatas, o volume de saliva a ser utilizado para a análise de cada analito foi alicotado em, no mínimo, dois microtubos com seus respectivos volume cada.

Os swabs que apresentavam sangue foram descartados para não interferir na análise dos dados, uma vez que todos os analitos estão presentes na corrente sanguínea. Nos casos em que o sangramento não cessava, o cão era retirado do projeto.

A coleta pré-banho foi realizada em uma sala que não a do banho e tosa, na ausência do proprietário. Já a coleta pós-banho foi realizada depois de finalizado os procedimentos de higiene, em uma sala separada ou na mesma sala do banho e tosa.

4.3.3 Análise ambiental

A estrutura dos estabelecimentos e a conduta dos funcionários e médicos veterinários foram analisadas visando os pontos críticos que pudessem causar danos à saúde dos animais. As variáveis apresentadas no quadro 2 abaixo foram avaliadas através do método de observação direta estruturada realizada igualmente em ambos os estabelecimentos, durante os procedimentos de banho e tosa.

Quadro 2 – Variáveis da observação estruturada dos estabelecimentos A e B

Equipamentos e instrumentos de banho e secagem
Soprador
Secador
Toalhas
Banheiras
Temperatura da água
Ralos
Coleiras e guias

Mesas de procedimentos
Coleiras e guias
Tomadas e fios elétricos
Tesouras e escovas
Gaiolas
Grades
Coleiras e guias
Limpeza
Ventilação
Ar-condicionado e ventiladores
Janelas e portas
Conduta dos funcionários e médicos veterinários
Histórico do animal
Avaliação prévia de parâmetros fisiológicos

Fonte: (MARIA, A. C. B. E., 2015)

4.4 ETAPA 2: ANÁLISE LABORATORIAL

As análises de cortisol e cromogranina A salivares foram realizadas através de um ensaio imunoenzimático (ELISA), em que cada kit continha uma microplaca de 96 poços com anticorpo específico, sendo ambas realizadas em duplicata intra-ensaio. Os níveis de cortisol salivar foram analisados através de um kit denominado Salimetrics Salivary Cortisol Kit e os níveis de cromogranina A salivar foram analisados através de um kit denominado Human Chromogranin A (Yanaihara Institute).

As análises foram realizadas no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

As análises do cortisol salivar foram realizadas de acordo com o fabricante (Salimetrics). As análises da cromogranina A salivar foram realizadas utilizando uma

diluição da amostra pura de 1:100 e corrigidas pela proteína total da amostra através da técnica de Bradford, conforme requisito do fabricante (Yanaihara Institute).

4.5 ETAPA 3: ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados pelo programa estatístico GraphPad Prism 6 tendo o valor de corte de 0,05, ou seja, uma confiança de 95% (valores abaixo de 0,05 indicam existência de diferenças significativas). Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão.

Foram utilizados os seguintes testes: Wilcoxon (amostras pareadas e não paramétricas), Teste t (amostras pareadas e paramétricas), Mann-Whitney (amostras independentes e não paramétricas), Kruskal-Wallis (conjunto de amostras independentes e não paramétricas), Exato de Fisher (teste de dependência para amostras pequenas) e coeficiente de correlação de Spearman (teste de correlação para amostras não paramétricas).

5 RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados referentes aos níveis de cortisol e cromogranina A salivares, como também as análises dos parâmetros fisiológicos e comportamentais, raça, sexo e idade. Para todas as análises estatísticas, apenas valores de $p < 0,05$ foram considerados significativas.

5.1 QUESTIONÁRIO ESPECÍFICO

Foi entregue a todos os proprietários um questionário específico (Apêndice B) com perguntas a cerca questões acerca da idade ao primeiro procedimento, frequência com a qual o cão é levado ao *pet shop*, eventuais episódios de agressão a funcionários ou lesões observadas no animal após o banho e tosa. Dos 33 questionários entregues, 23 foram respondidos.

Em relação à idade ao primeiro procedimento, 89,47% dos animais começaram a frequentar o pet shop em idade igual ou inferior a 6 meses (17 dos 19 cães cujos proprietários forneceram este dado). Além disso, 22,7% dos proprietários relataram a presença de lesões nos animais após o banho, associadas a: máquina de tosa (40%); grades da gaiola onde os animais são colocados antes e após o banho (20%); corte de garras (20%) e tosa com tesoura (20%). Não foram relatadas agressões anteriores a funcionários de *pet shops*.

Os proprietários relataram que ao retornarem dos procedimentos os cães apresentavam sinais de cansaço (43,5%), inquietação (4,3%) e o restante (52,2%) responderam que seus cães voltavam sem alterações de comportamento.

5.2 RAÇA, SEXO E IDADE

Os dados abaixo mostram a distribuição dos animais de acordo com a raça, sexo e idade (Gráficos 1, 2 e 3), independente do estabelecimento.

Gráfico 1 - Distribuição numérica de cães por raça

Legenda: Observar a maior incidência de cães da raça Shih-tzu e Lhasa-apso dentre as 13 raças observadas no estudo. *SRD – Sem raça definida

Gráfico 2 - Distribuição percentual de cães por sexo

Legenda: Observar a maior incidência de cães fêmea.

Gráfico 3 - Distribuição percentual de cães por faixa etária

Legenda: Observar a maior incidência de cães adultos jovens e adultos, seguidos por jovens e idosos.

5.3 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS PRÉ E PÓS-BANHO

Frequência cardíaca pré e pós-banho

As frequências cardíacas foram avaliadas 32 dos 33 animais, pois um animal encontrava-se em extrema agitação e nervosismo, o que dificultou a auscultação e para que esta agitação não interferisse nos seus valores hormonais, optou-se por não aferi-la.

Podemos observar que a frequência cardíaca variou de 84 a 200 bpm (133.9 ± 29.99) pré-banho e de 84 a 198 bpm (129.8 ± 29.26) pós-banho. Para analisarmos se houve diferença significativa entre os dois tempos foi utilizado o teste *t* pareado, o que constatou um $p > 0,05$, portanto não apresentaram diferença significativa entre os dois tempos, apesar de se observar uma média discretamente maior na frequência pré-banho. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráfico 4 a seguir.

Gráfico 4 - Médias das frequências cardíacas pré e pós-banho

Legenda: Observar a ausência de diferença estatística entre os dois tempos, apesar das médias pós-banho da frequência cardíaca serem discretamente menores.

Frequência Respiratória pré e pós-banho

As frequências respiratórias foram avaliadas em 31 dos 33 animais, pois dois animais encontravam-se em extrema agitação e nervosismo, o que dificultou a auscultação, como também a visualização dos movimentos respiratórios e para que esta agitação não interferisse nos seus valores hormonais, optou-se por não aferi-la.

Podemos observar que a frequência respiratória variou de 24 a 240 mpm (89.65 ± 61.78) pré-banho e de 25 a 280 mpm (119.6 ± 72.10) pós-banho, conforme gráfico abaixo. Para analisarmos se houve diferença significativa entre os dois tempos foi utilizado o teste *t* pareado, o que constatou um $p < 0,05$, portanto apresentaram diferença significativa entre os dois tempos. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráfico 5 a seguir.

Gráfico 5 - Médias das frequências respiratórias pré e pós-banho

Legenda: Observar a diferença estatística entre os dois tempos, com um aumento significativo da frequência respiratória pós-banho.

Temperatura pré e pós-banho

Podemos observar que a temperatura corpórea variou de 37.8 a 39.8 C° (39±0.42) pré-banho e de 38.2 a 39.7 C° (38.9±0.36) pós-banho, conforme gráfico abaixo. Para analisarmos se houve diferença significativa entre os dois tempos foi utilizado o teste *t* pareado, o que constatou um $p > 0,05$, portanto não apresentaram diferença significativa entre os dois tempos. Os dados são representados como média±desvio padrão no gráfico 6 a seguir.

Gráfico 6 - Médias temperaturas corpóreas pré e pós-banho

Legenda: Observar a ausência de diferença significativa entre os tempos.

Mucosas pré e pós-banho

Dos 33 animais avaliados neste estudo apenas um apresentou mudança na mucosa após o banho. Este animal apresentava as mucosas oculares, jugais e gengivais normocoradas e após o banho apresentou hiperemia da mucosa ocular.

5.4 VOLUME DE SALIVA COLETADO PRÉ E PÓS-BANHO

O volume de saliva coletado variou de 0,27ml a 1,44ml ($0,48 \pm 0,24$) no pré-banho e de 0,28ml a 1,1ml ($0,42 \pm 0,20$) no pós-banho. Para analisarmos se houve diferença significativa entre os volumes de saliva nos dois tempos foi utilizado o teste de Wilcoxon, o que constatou um $p < 0,05$, demonstrando uma diferença significativa entre os dois tempos. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráfico 7 a seguir.

Gráfico 7 - Médias do volume de saliva coletado no pré e pós-banho

Legenda: Observar a diferença significativa entre os dois tempos, com uma maior produção de saliva pré-banho.

5.5 CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES PRÉ E PÓS BANHO

Cortisol salivar pré e pós-banho

Os resultados obtidos por meio do ensaio imunoenzimático demonstrou que a concentração de cortisol presente na saliva dos cães variou de 0,07 a 1,771 $\mu\text{g/dl}$ ($0,455 \pm 0,375$) pré-banho e de 0,05 a >3.150 $\mu\text{g/dl}$ ($0,733 \pm 0,712$) pós-banho. Para analisarmos se houve diferença significativa entre os dois tempos foi utilizado o teste de Wilcoxon, o que constatou um $p < 0,05$, demonstrando uma diferença significativa entre os dois tempos. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráfico 8 a seguir.

Gráfico 8 - Médias das concentrações salivares de cortisol pré e pós-banho

Legenda: Observar a diferença significativa entre os dois tempos, com um aumento nos níveis de cortisol salivar pós-banho.

Cromogranina A salivar pré e pós-banho

Os resultados obtidos por meio do ensaio imunoenzimático demonstrou que a quantidade de cromogranina A presente na saliva dos cães variou de 7,360 a 269,6 pmol/mg ($59,64 \pm 56,71$) pré-banho e de 5,910 a 110,3 pmol/mg ($38,19 \pm 26,97$) pós-banho. Para analisarmos se houve diferença significativa entre os dois tempos foi utilizado o teste de Wilcoxon, o que constatou um $p < 0,05$, demonstrando uma

diferença significativa entre os dois tempos. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráfico 9 a seguir.

Gráfico 9 - Médias das concentrações salivares de cromogranina A pré e pós-banho

Legenda: Observar a diferença significativa entre os dois tempos, com um aumento nos níveis de cromogranina A salivar pré-banho.

5.6 CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES E OS ESTABELECIMENTOS A E B

Cortisol salivar no estabelecimento A e B

Na tabela 1 abaixo podemos observar a variação nos níveis de cortisol salivar entre os estabelecimentos A e B, no pré e pós-banho. Para analisarmos se houve diferença significativa entre os estabelecimentos, foi utilizado o teste Mann-Whitney, que constatou um $p>0,05$, demonstrando que não houve diferença significativa entre os estabelecimentos. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráfico 10 a seguir.

Tabela 1 - Variação nos níveis de cortisol salivar ($\mu\text{g/dl}$) entre os estabelecimentos

Estabelecimento	Pré-banho		Pós-banho	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
A	0.0700	1.771	0.0510	<3.150
B	0.1340	1.486	0.1300	1.574

Legenda: Observar a variação nos níveis de cortisol salivar entre os estabelecimentos, com seus valores mínimos e máximo registrados.

Gráfico 10 - Médias das concentrações de cortisol salivar nos estabelecimentos A e B

Legenda: Observar a ausência de diferença significativa entre os dois estabelecimentos, tanto no pré quanto no pós-banho.

Cromogranina A salivar no estabelecimento A e B

Na tabela 2 abaixo podemos observar a variação nos níveis de cromogranina A salivar entre os estabelecimentos A e B, no pré e pós-banho. Para analisarmos se houve diferença significativa entre os estabelecimentos, foi utilizado o teste Mann-Whitney, que constatou um $p>0,05$, demonstrando que não houve diferença significativa entre os estabelecimentos. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráfico 11 a seguir.

Tabela 2 - Variação nos níveis de cromogranina A salivar (pmol/mg) entre os estabelecimentos

Estabelecimento	Pré-banho		Pós-banho	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
A	7.360	269.6	5.910	110.3
B	13.26	113.7	9.790	99.89

Legenda: Observar a variação nos níveis de cromogranina A salivar entre os estabelecimentos, com seus valores mínimos e máximo registrados.

Gráfico 11 - Médias das concentrações de cromogranina A salivar nos estabelecimentos A e B

Legenda: Observar a ausência de diferença significativa entre os dois estabelecimentos, tanto no pré quanto no pós-banho.

5.7 CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES

No gráfico 12 abaixo podemos observar a correlação entre os níveis de cortisol e cromogranina A salivares apresentados pelos animais durante o procedimento de banho e tosa. Para analisarmos se houve diferença significativa entre os dois analitos foi utilizado o teste de coeficiente de correlação de Spearman, que apontou uma correlação negativa muito fraca entre os analitos, porém não significativa.

Gráfico 12 - Diagrama de dispersão dos níveis de cortisol salivar versus cromogranina A salivar

Legenda: Observar a ausência de correlação entre as variáveis.

5.8 CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES E RAÇA

Cortisol salivar e raça

Na tabela 3 abaixo podemos observar a variação dos níveis de cortisol salivar, pré e pós-banho, entre as raças Shih-tzu e Lhasa-apso, que foram as que apresentaram maior incidência no trabalho e os cães de outras raças. Para analisarmos se houve diferença significativa entre as raças, foi utilizado o Kruskal-Wallis, que constatou um $p > 0,05$, demonstrando que não houve diferença significativa entre as raças. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráfico 13 a seguir.

Tabela 3 - Variação nos níveis de cortisol salivar ($\mu\text{g/dl}$) entre as raças

Raças	Pré-banho		Pós-banho	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Shih-tzu	0.1440	0.5659	0.3640	0.8220
Lhasa-apso	0.1980	0.5560	0.1300	1.574
Outros	0.0700	0.5650	0.0510	3.150

Legenda: Observar a variação nos níveis de cortisol salivar entre as raças, com seus valores mínimos e máximo registrados.

Gráfico 13 - Média dos níveis de cortisol salivar entre as raças

Legenda: Observar a ausência de diferença significativas entre as raças, tanto no pré quanto no pós-banho.

Cromogranina A salivar e raça

Na tabela 4 abaixo podemos observar a variação dos níveis de cromogranina A salivar, pré e pós-banho, entre as raças Shih-tzu e Lhasa-apso, que foram as que apresentaram maior incidência no trabalho e os cães de outras raças. Para analisarmos se houve diferença significativa entre as raças, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, que constatou um $p < 0,05$. Utilizando o teste de Dunn's foi observado que a diferença se dá apenas em relação à raça Shih-tzu, tanto pré como pós-banho, comparada ao grupo Outros. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráfico 14 a seguir.

Tabela 4 - Variação nos níveis de cromogranina A salivar (pmol/mg) entre as raças

Raças	Pré-banho		Pós-banho	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Shih-tzu	7.360	55.49	5.910	47.12
Lhasa-apso	34.70	99.08	11.80	27.14
Outros	19.19	269.6	16.38	110.3

Legenda: Observar a variação nos níveis de cromogranina A salivar entre as raças, com seus valores mínimos e máximo registrados.

Gráfico 14 - Média dos níveis de cromogranina A salivar entre as raças

Legenda: Observar a diferença significativa entre os cães da raça Shih-tzu, tanto no pré quanto no pós-banho.

5.9 CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES E IDADE

Cortisol salivar e idade

Na tabela 5 abaixo podemos observar a variação nos níveis de cortisol salivar entre as faixas etária, no pré e pós-banho. Para analisarmos se houve diferença significativa entre as faixas etárias, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, que constatou um $p>0,05$, demonstrando que não houve diferença significativa entre as faixas etárias. Os dados são representados como média±desvio padrão no gráfico 15 a seguir.

Tabela 5 - Variação nos níveis de cortisol salivar ($\mu\text{g/dl}$) entre as faixas etárias

Faixa etária	Pré-banho		Pós-banho	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Jovem (< 1 ano)	0,171	1,771	0,387	>3,15
Adulto Jovem (1 a 3 anos)	0,07	0,942	0,051	>3,15
Adulto (3 a 8 anos)	0,134	0,741	0,19	1,574
Idoso (> 8 anos)	0,163	1,486	0,297	1,194

Legenda: Observar a variação nos níveis de cortisol salivar entre as faixas etárias, com seus valores mínimos e máximo registrados.

Gráfico 15 - Média dos níveis de cortisol salivar entre as faixas etárias

Legenda: Observar a ausência de diferença significativas entre as faixas etárias, tanto no pré quanto no pós-banho.

Cromogranina A salivar e idade

Na tabela 6 abaixo podemos observar a variação nos níveis de cromogranina A salivar entre as faixas etárias, no pré e pós-banho. Para analisarmos se houve diferença significativa entre as faixas etárias, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, que constatou um $p > 0,05$, demonstrando que não houve diferença significativa entre as faixas etárias. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráfico 16 a seguir.

Tabela 6 - Variação nos níveis de cromogranina A salivar (pmol/mg) entre as faixas etárias

Faixa Etária	Pré-banho		Pós-banho	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Jovem (< 1 ano)	13,26	55,49	9,79	47,12
Adulto Jovem (1 a 3 anos)	7,36	269,6	5,91	54,96
Adulto (3 a 8 anos)	18,49	172,8	15,18	110,3
Idoso (> 8 anos)	16,22	113,7	15,67	99,89

Legenda: Observar a variação nos níveis de cromogranina A salivar entre as faixas etárias, com seus valores mínimos e máximo registrados.

Gráfico 16 - Média dos níveis de cromogranina A salivar entre as faixas etárias

Legenda: Observar a ausência de diferença significativas entre as faixas etárias, tanto no pré quanto no pós-banho.

5.10 CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES E SEXO

Os dados abaixo mostram a variação dos níveis de cortisol e cromogranina A salivares entre os sexos, no pré e pós-banho, como também nos animais castrados e não castrados.

Cortisol salivar e sexo

Na tabela 7 abaixo podemos observar a variação nos níveis de cortisol salivar entre os sexos, no pré e pós-banho. Para analisarmos se houve diferença significativa entre os sexos e entre os animais castrados e não castrados, foi utilizado o teste Mann-Whitney, que constatou um $p > 0,05$, demonstrando que não houve diferença significativa em nenhuma das análises. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráficos 17 e 18 a seguir.

Tabela 7 - Variação nos níveis de cortisol salivar ($\mu\text{g/dl}$) entre os sexos

Sexo	Pré-banho		Pós-banho	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Fêmea	0.144	1.771	0.19	< 3.15
Macho	0.07	0.822	0.051	< 3.15

Legenda: Observar a variação nos níveis de cortisol salivar entre os sexos, com seus valores mínimos e máximo registrados.

Gráfico 17 - Média dos níveis de cortisol salivar entre os sexos

Legenda: Observar a ausência de diferença significativas entre os sexos, tanto no pré quanto no pós-banho.

Gráfico 18 - Média dos níveis de cortisol salivar entre os animais castrados e não castrados

Legenda: Observar a ausência de diferença significativas os animais castrados e não castrados, tanto no pré quanto no pós-banho.

Cromogranina A salivar e sexo

Na tabela 8 abaixo podemos observar a variação nos níveis de cromogranina A salivar entre os sexos, no pré e pós-banho. Para analisarmos se houve diferença significativa entre os sexos e entre os animais castrados e não castrados, foi utilizado o teste Mann-Whitney, que constatou um $p > 0,05$, demonstrando que não houve diferença significativa em nenhuma das análises. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráficos 19 e 20 a seguir.

Tabela 8 - Variação nos níveis de cromogranina A salivar (pmol/mg) entre os sexos

Sexo	Pré-banho		Pós-banho	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Fêmea	7.36	269.6	5.91	103.6
Macho	18.49	116.0	15.18	110.3

Legenda: Observar a variação nos níveis de cromogranina A salivar entre os sexos, com seus valores mínimos e máximo registrados.

Gráfico 19 - Média dos níveis de cromogranina A salivar entre os sexos

Legenda: Observar a ausência de diferença significativas entre os sexos, tanto no pré quanto no pós-banho.

Gráfico 20 - Média dos níveis de cromogranina A salivar entre os animais castrados e não castrados

Legenda: Observar a ausência de diferença significativas entre os animais castrados e não castrados, tanto no pré quanto no pós-banho.

5.11 CORRELAÇÃO ENTRE CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES COM OS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS

Os gráficos abaixo mostram a correlação entre os níveis de cortisol e cromogranina A salivares com a frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corporal.

Cortisol salivar e parâmetros fisiológicos

Podemos observar a correlação entre os níveis de cortisol salivar com as frequências cardíaca e respiratória e temperatura corporal (Gráfico 21 A, B e C). Para analisarmos se houve correlação entre as variáveis, foi utilizado o teste de coeficiente de correlação de Spearman, que constatou uma fraca correlação positiva com a frequência cardíaca, uma correlação constante com a temperatura corporal e a uma correlação positiva muito fraca com a frequência respiratória, porém não significativa.

Gráfico 21- Diagrama de dispersão dos níveis de cortisol salivar versus frequência cardíaca (A), frequência respiratória (B) e temperatura corporal (C)

Legenda: Observar a ausência de correlação entre os parâmetros fisiológicos e o cortisol salivar.

Cromogranina A salivar e parâmetros fisiológicos

Podemos observar a correlação entre os níveis de cromogranina A salivar com as frequências cardíaca e respiratória e temperatura corporal (Gráfico 22 A, B e C). Para analisarmos se houve correlação entre as variáveis, foi utilizado o teste de coeficiente de correlação de Spearman, que constatou uma correlação positiva muito fraca com a frequência cardíaca, porém não significativa e ausência de correlação com a frequência respiratória e a temperatura corporal.

Gráfico 22 - Diagrama de dispersão dos níveis de cromogranina A salivar versus frequência cardíaca (A), frequência respiratória (B) e temperatura corporal (C)

Legenda: Observar a ausência de correlação entre os parâmetros fisiológicos e a cromogranina A salivar.

5.12 CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES E FREQUÊNCIA DO BANHO

A frequência com que os animais frequentam o pet shop variou de uma vez por semana a esporádica, ou seja, mais de um mês de intervalo. Dos 23 proprietários que responderam ao questionário, 9 apontaram que levavam seus cães uma vez por semana ao estabelecimento, 10 levavam a cada 15 dias e 4 levavam seus cães uma vez por mês ou em intervalo maiores.

Cortisol salivar e frequência do banho

O gráfico abaixo mostra a diferenças entre os níveis de cortisol salivar e a frequência com que os cães vão ao banho e tosa. Para analisarmos se houve diferença significativa entre as frequências de banhos, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, que constatou um $p > 0,05$, demonstrando que não houve diferença significativa em nenhum dos tempos. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráfico 23 a seguir.

Gráfico 23 - Média dos níveis de cortisol salivar entre as frequências de banho

Legenda: Observar a ausência de diferença significativa entre as frequências de banho realizadas pelos cães, tanto no pré quanto no pós-banho.

Cromogranina A salivar e frequência do banho

O gráfico abaixo mostra a diferenças entre os níveis de cromogranina A salivar e a frequência com que os cães vão ao banho e tosa. Para analisarmos se houve diferença significativa entre as frequências de banhos, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, que constatou um $p < 0,05$, demonstrando que houve diferença significativa apenas para os cães que frequentam o banho 1 vez por semana. Os dados são representados como média $\pm$ desvio padrão no gráfico 24 a seguir.

Gráfico 24 - Média dos níveis de cromogranina A salivar entre as frequências de banho

Legenda: Observar a ausência de diferença significativa entre as frequências de banho realizadas pelos cães, tanto no pré quanto no pós-banho.

5.13 CORTISOL E CROMOGRANINA A SALIVARES E COMPORTAMENTO (C-BARQ©)

A tabela 9 a seguir mostra a probabilidade de dependência dos níveis de cortisol e cromogranina A salivares pós-banho em relação aos sinais de agressividade, medo, ansiedade de separação e treinamento apresentados pelos cães, segundo os proprietários.

Para a realização deste teste, os níveis de cortisol e cromogranina A salivares foram agrupados em baixo e alto, tendo como parâmetro os valores de mediana. Dos 33 animais utilizados neste estudo, 22 proprietários responderam o questionário do C-BARQ©.

Para analisarmos se houve relação entre o aumento de cortisol e cromogranina A salivares durante o banho e tosa com os comportamentos foi utilizado o teste Exato de Fisher, que constatou um $p>0,05$, demonstrando que não há relação entre as variáveis.

Tabela 9 - Probabilidade de dependência dos níveis de cortisol e cromogranina A salivares em relação ao comportamento (C-BARQ©)

Comportamento	N=22	p-valor	
		Cortisol	Cromogranina
Agressividade	14	0.4441	0.3783
Medo	11	0.7036	0.6882
Separação	14	1.0000	0.6951
Treinamento	11	1.0000	0.2262

Legenda: Observar que não há dependência entre os animais de cortisol e cromogranina A salivares com o comportamento do animal fora do ambiente de banho e tosa.

5.14 COMPORTAMENTO DA CHEGADA AO ESTABELECIMENTO E DURANTE OS PROCEDIMENTOS DE BANHO E SECAGEM

Dos 33 animais analisados no estudo, 18,2% não foram observados durante o momento da chegada ao estabelecimento, 36,3% apresentaram dificuldade para entrar no estabelecimento, 18,2% entraram no colo do proprietário e 27,3% dos animais entraram voluntariamente no estabelecimento.

A tabela 10 a seguir mostra o comportamento dos animais durante o banho e a secagem. Para analisarmos se houve diferença significativa entre os dois tempos foi utilizado o teste Exato de Fisher, o que constatou um $p < 0,05$ apenas em relação à rigidez dos membros e a lambedura do plano nasal, demonstrando uma diferença significativa entre os dois tempos nestes comportamentos.

Tabela 10 - Comportamento apresentado pelos cães durante os procedimentos de banho e secagem (n=33).

Comportamento	Banho	Secagem	(continua)
			Valor de p
Dorso arqueado	40%	54,28%	0.4586
Membros rígidos	22,85%	45,71%	0.0332*
Orelhas para trás	62,85%	57,14%	0.7828
Cauda abaixada/entre as pernas	60%	77,14%	0.2600

(continuação)

Comportamento	Banho	Secagem	Valor de p
Lambedura do plano nasal	20%	65,71%	<0.0001*
Tremores	60%	77,14%	0.4431
Choros	17%	8,57%	0.7330
Latidos	2,85%	11,42%	0.3553
Uivos	2,85%	5,71%	1.0000

Legenda: Nota-se que dentre os comportamentos observados durante os procedimentos, apenas dois diminuíram no momento da secagem (orelhas para trás e choro) *Diferença significativa entre os tempos.

5.15 ANÁLISE AMBIENTAL

Os quadros 3 e 4 abaixo mostram os resultados encontrados para as variáveis que caracterizam os pontos críticos dos estabelecimentos.

Quadro 3 – Resultado da observação direta dos pontos críticos no estabelecimento A

Equipamentos e instrumentos de banho e secagem
Soprador: Aparelho encontra-se embaixo da mesa de procedimentos e dentro de uma caixa acústica para abafar o som. Em todos os procedimentos o bocal do aparelho estava presente.
Secador: Aparelho com pedestal e duto de saída de ar em tubo de metal, apresentando diferentes temperaturas. A temperatura utilizada variava entre morno e médio e era somente acionado quando necessário.
Toalhas: Eram provenientes de uma empresa que realizava a esterilização e utilizadas individualmente para cada animal.
Banheiras
Temperatura da água: Temperatura agradável constatada pelo banhista, sempre respeitando a temperatura ambiente.
Ralos: Ralos apresentando tampas compatíveis com o seu tamanho.
Coleiras e guias: As guias eram presas à parede por uma ventosa, mas raramente eram utilizadas. Os animais não usam coleiras durante o banho.
Mesas de procedimentos
Coleiras e guias: As guias eram presas à mesa por meio de uma haste em sua lateral e utilizadas em todos os procedimentos.
Tomadas e fios elétricos: As tomadas e fios elétricos ficam fora do alcance dos animais.
Tesouras e escovas: Os instrumentos permaneciam em cima da mesa durante todo o procedimento

de secagem do animal e após a utilização, na maioria das vezes, eram guardados em gavetas.
Gaiolas
Grades: As gaiolas era confeccionadas em metal, com grades em todos os seus 6 lados e fechadas com um trinco que impossibilitava a abertura pelo animal. Era composta por 6 boxes de tamanhos variados.
Coleiras e guias: A maioria dos animais era colocada no interior da gaiola sem suas coleiras e guias, sendo estas colocadas quando da chegada do proprietário.
Limpeza: As gaiolas eram limpas durante o expediente apenas quando apresentavam sujidades. Não havia um critério para utilização dos boxes por animais recém-chegados daqueles que já havia sido higienizado.
Ventilação
Ar-condicionado e ventiladores: Presença de um ar-condicionado que era ligado de acordo com a temperatura do ambiente.
Janelas e portas: Presença de uma janela do tipo basculante. A parede contrária às banheiras apresentava uma janela de vidro - para a visualização do procedimento pelo proprietário – e uma porta de vidro com grade de proteção própria para animais. Na maior parte do tempo, a porta de vidro era mantida fechada, principalmente quando animais mais agitados estavam no recinto.
Conduta dos funcionários e médicos veterinários
Histórico do animal: Apenas os animais que passam por consulta na clínica apresentavam histórico médico.
Avaliação prévia de parâmetros fisiológicos: Não era realizada avaliação prévia dos parâmetros fisiológicos do animal.

Quadro 4 – Resultado da observação direta dos pontos críticos no estabelecimento B

Equipamentos e instrumentos de banho e secagem
Soprador: Aparelho encontra-se embaixo da mesa de procedimentos, porém não se utiliza caixa acústica. Na maior parte dos procedimentos o bocal estava presente, porém em alguns casos este era retirado para diminuir o desconforto do animal.
Secador: Aparelho com pedestal e duto de saída de ar em tubo de metal, apresentando diferentes temperaturas. A temperatura utilizada variava entre morno e médio. O secador era acionado quando necessário ou usado juntamente com o soprador em cães de raças de porte grande e com muito pelo, como no caso da raça Golden Retriever.
Toalhas: Eram provenientes de uma empresa que realizava a esterilização e utilizadas individualmente para cada animal.
Banheiras
Temperatura da água: Temperatura agradável constatada pelo banhista, sempre respeitando a temperatura ambiente.
Ralos: Ralos apresentando tampas compatíveis com o seu tamanho.
Coleiras e guias: As guias eram presas à parede por um gancho de metal, mas raramente eram utilizadas. Os animais não usam coleiras durante o banho.
Mesas de procedimentos
Coleiras e guias: As guias eram presas à mesa por meio de uma haste em sua lateral e também a um gancho de metal fixado à parede, porém raramente eram utilizadas.
Tomadas e fios elétricos: As tomadas e fios elétricos ficam fora do alcance dos animais.
Tesouras e escovas: Os instrumentos permaneciam em cima da mesa durante todo o procedimento de secagem do animal e após a utilização, na maioria das vezes, eram guardados em gavetas.

Gaiolas
<p>Grades: As gaiolas era confeccionadas em metal, com grades em todos os seus 6 lados e fechadas com um trinco que impossibilitava a abertura pelo animal. Era composta por 6 boxes de tamanhos variados.</p>
<p>Coleiras e guias: A maioria dos animais era colocada no interior da gaiola sem suas coleiras e guias, sendo estas colocadas quando da chegada do proprietário.</p>
<p>Limpeza: As gaiolas eram limpas durante o expediente apenas quando apresentavam sujidades. Não havia um critério para utilização dos boxes por animais recém-chegados daqueles que já havia sido higienizado.</p>
Ventilação
<p>Ar-condicionado e ventiladores: Presença de um ventilador no teto que era ligado de acordo com a temperatura do ambiente.</p>
<p>Janelas e portas: Presença de uma janela do tipo basculante. A parede contrária às mesas de procedimento apresentava uma porta que dava para o quintal, com grade própria para animais, que era mantida fechada na maioria do tempo, pois havia animais do próprio estabelecimento no quintal. Na parede contrária as banheiras havia a porta de entrada com um vidro – para a visualização do procedimento pelo proprietário – e que era mantida sempre fechada.</p>
Conduta dos funcionários e médicos veterinários
<p>Histórico do animal: Apenas os animais que passam por consulta na clínica apresentavam histórico médico.</p>
<p>Avaliação prévia de parâmetros fisiológicos: Não era realizada avaliação prévia dos parâmetros fisiológicos do animal.</p>

6 DISCUSSÃO

O estudo realizado com 33 cães que se submeteram a procedimentos de banho e tosa em dois estabelecimentos da cidade de São Paulo mostrou diversos resultados a cerca do estresse que tais procedimentos causam nos animais. A seguir, os resultados serão discutidos na sequência em que foram apresentados.

Questionário específico

No questionário entregue aos proprietários pudemos observar que muitos relataram que seus cães já haviam sofrido algum acidente durante o banho e tosa, porém sem gravidade.

Acidentes isolados podem acontecer durante tais procedimentos, porém devem ser evitados ao máximo. Como prevenção, banhistas e tosadores devem ser altamente capacitados para exercer tal função e o médico veterinário deve estar presente no estabelecimento, conforme Resolução nº 878, de 15 de fevereiro de 2008, do Conselho Federal de Medicina Veterinária (BRASÍLIA, 2008), garantindo assim saúde e bem-estar aos animais.

Quase metade dos proprietários relata que seus cães voltavam dos procedimentos apresentando sinais de cansaço. Esse cansaço é reflexo da ativação dos eixos SAM e principalmente do eixo HPA por conta do grande gasto de energia.

Raça, idade e sexo

Ao analisarmos os resultados observamos uma maior incidência de cães das raças Shih-tzu (24,2%) e Lhasa-apso (15,1%), o que também foi observado por Maria (2010) em um levantamento realizado em pet shops da cidade de São Paulo com 2642 cães de diversas raças. O fato de essas raças apresentarem uma maior incidência deve-se ao fato de serem raças que demandam maior cuidado quanto a sua higiene e tosa, por apresentarem pelos longos e de difícil manejo.

Em relação ao sexo dos cães observamos uma maior incidência de fêmeas (61%). Já em relação à idade, observamos uma maior incidência de cães adultos (37%) seguidos pelos adultos jovens (30%).

Segundo os médicos veterinários e funcionários dos estabelecimentos, a incidência de cães com idade avançada é menor devido ao fato de muitos proprietários acharem desnecessário o animal passar por uma situação desconfortável como o banho. Muitas vezes, os próprios médicos veterinários e funcionários aconselhavam a se evitar o banho nestes casos.

Parâmetros fisiológicos pré e pós-banho

Os resultados mostram que a frequência cardíaca dos animais praticamente se manteve a mesma no pré-banho e pós-banho e apenas um pouco elevada em relação aos valores normais que variam de 60 a 110 bpm em cães de raças grandes e de 100 a 150 bpm em cães de raças pequenas. Levando em conta que 81% dos animais deste estudo são de raças pequenas a médias, os valores observados não variaram muito do padrão.

Em um estudo realizado por Beerda et al. (1998) foi verificado a frequência cardíaca de cães frente a 5 estímulos sendo a frequência cardíaca máxima observada de 183 bpm, muito próximo do observado neste estudo que foi 200 bpm.

Tanto a ativação do eixo SAM quanto do eixo HPA fazem a frequência cardíaca aumentarem, portanto é normal a frequência cardíaca estar aumentada nos dois tempos.

Em um estudo realizado por Engeland et al. (1990) com cães observou-se que o barulho repentino aumenta a frequência cardíaca, pressão arterial e a atividade de ambos os eixos.

Em relação à frequência respiratória observamos um aumento na frequência pós-banho em relação ao pré-banho. A frequência respiratória normal do cão varia de 10 a 30 mpm, ficando muito abaixo da média observada neste trabalho. Assim como observado com a frequência cardíaca, o aumento da frequência respiratória é compatível com a ativação do eixo SAM.

Muitos animais já chegavam ao estabelecimento com a frequência respiratória aumentada e como não havia tempo hábil para esperar por esta diminuir até próximo dos níveis normais, os valores pré-banho já se iniciavam altos.

Em relação à temperatura corpórea, se observou praticamente nenhuma diferença entre as médias pré-banho e pós-banho. A média, tanto pré quanto pós-banho encontra-se bem próximo do valor máximo aceitável da temperatura de cães

em repouso que é de 39,0°C em média. Como os animais não estavam em repouso e encontravam-se ligeiramente agitados, as temperaturas observadas estão dentro dos parâmetros aceitáveis.

Alguns estudos mostram que o estresse agudo eleva a temperatura corpórea nos animais, porém não foi o observado neste estudo. A hipótese mais aceitável é o fato do uso do soprador para a secagem dos animais, pois este apresenta vento em temperatura ambiente, o que poderia favorecer a diminuição da temperatura pós-banho, chegando ao valor pré-banho, como também o uso de ar condicionado e ventiladores no ambiente.

Volume de saliva coletado pré e pós-banho

O volume de saliva coletado entre os dois tempos apresentou diferença significativa, apontando uma diminuição no pós-banho, fortalecendo o observado durante as coletas.

A maior parte dos animais demorava mais para atingir os 0,5ml de saliva necessária para a realização dos testes, sendo que muitos não atingiam esta quantidade, tendo que parar a coleta para que esta não interferisse nos valores do cortisol. Mesmo utilizando estímulos para a salivação, os animais não salivavam como no pré-banho.

Em um dos casos, o animal já apresentava uma diminuição na produção de saliva no pré-banho e após o procedimento, a produção de saliva diminuiu a tal ponto que o swab se quer ficou úmido. Frente a isto, o animal foi retirado do projeto.

O fato dos animais diminuírem a salivação no pós-banho demonstra que a atividade do ramo simpático do sistema nervoso autônomo era mais intensa e se sobressaía sobre a atividade do ramo parassimpático, como descrito por Lovallo e Sollers (2007), dado que sua ativação causa uma diminuição do fluxo salivar.

Cortisol e cromogranina A salivares pré e pós-banho

Sabe-se que o estresse gera uma ativação do eixo HPA, liberando assim cortisol na corrente sanguínea. Este cortisol se encontrará aumentado na saliva por volta de 5 minutos após a manipulação do animal, sendo representativo de uma

parcela do cortisol livre do soro (VINCENT; MICHELL, 1992; KOBELT et al., 2003; DRESCHER; GRANGER, 2009b).

Apesar de a saliva ser um método não invasivo, a maioria dos animais se sentia incomodado com a presença do swab em suas bocas, o que em teoria poderia fazer a concentração plasmática de cortisol aumentar. Para que a manipulação do animal não interferisse no nível de cortisol, foi estipulado o tempo de aproximadamente 5 minutos para a coleta de saliva, mesmo que o volume final não atingisse 500µl.

Em relação à presença de cromogranina A na saliva, não há informações na literatura sobre relação dos níveis plasmáticos e salivares. A cromogranina A é uma proteína produzida principalmente pelas células cromafins da medula da adrenal, sendo liberada juntamente com a adrenalina e noradrenalina, como também armazenada nos grânulos secretórios dos neurônios e das células acinares das glândulas salivares, sendo liberada por estimulação nervosa simpática (SOMOGYI et al., 1984; DOSS et al., 1998; SATO et al., 2002; CRONIN et al., 2003; SARUTA et al., 2005; KANAI et al., 2008; STRIDSBERG et al., 2014). Frente a estas informações, admite-se que a cromogranina A já esteja presente na saliva do cão ao ser manipulado.

Como observado nos resultados, a diferença entre a média dos níveis de cortisol salivar é bastante significativa, demonstrando que os procedimentos de banho e tosa são estressantes para o animal, remetendo à fase de alarme descrita inicialmente por Selye (1936), o que corrobora com um trabalho realizado em um banho e tosa com os níveis plasmáticos de cortisol em cães da raça poodle (MEDEIROS, 2007).

A concentração de cortisol presente na saliva dos cães apresentou uma concentração média de 455 µg/dl pré-banho e de 733 µg/dl pós-banho. A concentração basal média de cortisol salivar descrita em literatura varia de 0.156 µg/dl a 0.360 µg/dl (VINCENT; MICHELL, 1992; BEERDA et al., 1998; DRESCHER; GRANGER, 2009b; BENNETT; HAYSEN, 2010), o que não difere muito das concentrações médias observadas durante o pré-banho, uma vez que o ambiente de banho e tosa já é um agente estressor devido a presença de pessoas, cheiros e sons não familiares ao animal.

No estudo realizado por Medeiros (2007) observou-se, por meio das concentrações médias do cortisol, que os níveis aumentaram em 71% no pós-

banho. Em nosso trabalho observamos um valor semelhante, onde o aumento nos níveis pós-banho foram de 61%.

Podemos destacar um fato isolado em relação aos níveis de cortisol salivar, onde apenas dois cães apresentaram os maiores níveis no pós-banho e um dos maiores no pré-banho. Estes dois cães são fêmea e macho da raça Shar-pei, no entanto, não se pode confirmar a relação entre raça e o nível de cortisol salivar, uma vez que, além de o grupo racial ser pequeno ($n=2$), estes animais pertencem ao mesmo proprietário. Logo, o método de criação desses cães deve ser considerado um fator de interferência.

Níveis de cortisol salivar como os observados nos dois cães da raça Shar-pei também foram observados no estudo realizado por Beerda (2007). Neste estudo os animais tiveram a saliva coletada antes e após estímulos estressores como empurrar o animal contra o chão, abertura de guarda-chuva, jogar uma mala de 600g no chão, barulho e choque elétrico. Um cão apresentou uma elevação extrema do cortisol salivar frente ao estímulo de empurrá-lo contra o chão, apresentando 3.649 $\mu\text{g/dl}$. A média de concentração de cortisol salivar neste estudo foi de 0.660 $\mu\text{g/dl}$, semelhante ao observado em nosso estudo.

Podemos concluir então que os níveis de cortisol salivar apresentados pelos cães neste presente estudo estão em acordo com os níveis observados em literatura, principalmente com o trabalho de Medeiros (2007) sobre o estresse no banho e tosa.

Em relação à concentração de cromogranina A salivar, observamos uma diferença significativa entre o pré e o pós-banho, porém ao contrário do que se observou no cortisol salivar, o nível de cromogranina A salivar diminuiu após o banho.

A concentração de cromogranina A na saliva dos cães apresentou uma ampla variação de 7,360 a 269,6 pmol/mg no pré-banho. Até o momento há apenas um artigo publicado por Kanai et al. (2008) sobre a concentração de cromogranina A salivar em cães, relatando não haver variação circadiana nos níveis de cromogranina A salivar, sendo que a concentração basal encontrada na saliva dos cães foi de aproximadamente 3.20 pmol/mg , muito abaixo do observado neste trabalho.

O fato dos níveis de cromogranina A salivares estarem muito acima dos observados por Kanai et al. (2008) demonstra a intensa ativação do eixo SAM, fato

observado inicialmente por Selye (1936) que remete à ação de “luta e fuga” da fase de alarme da síndrome geral de adaptação.

Outro fator a ser apontando em relação aos altos níveis de cromogranina A na saliva destes cães é a passagem passiva da proteína plasmática para o interior da glândula salivar, o que acarretaria em um aumento nos níveis salivares (KANNO et al., 1999)

Sabe-se que a cromogranina A é um excelente marcador para tumores endócrinos, uma vez que ela é armazenada nos grânulos secretórios de diversos órgãos endócrinos como a adrenal, pâncreas, tireoide, paratireoide, hipófise, entre outros (DOSS et al., 1998). Na tentativa de minimizar interferências nos resultados da cromogranina A salivar, animais que apresentavam algum distúrbio endócrino eram retirados do trabalho.

No questionário entregue aos proprietários constavam perguntas a cerca da saúde do animal, onde em nenhum momento foi citado a presença de doenças que pudessem interferir no estudo. Como alguns distúrbios endócrinos e até mesmo tumores podem passar despercebidos pelo proprietário em um primeiro momento, não podemos descartar a hipótese de algum animal apresentar alguma doença relacionada, como no caso do animal que apresentou uma concentração de cromogranina A salivar de 269,6 pmol/mg.

O fato dos níveis de cromogranina A salivares diminuírem após o banho se dá pelo fato das células acinares das glândulas salivares liberarem praticamente todo o seu conteúdo em um período de uma hora após um estímulo estressor que ative o eixo SAM, conforme observado por Amsterdam et al. (1969) e Castle et al. (1972). Kanai et al. (2008) também observou um decréscimo nos níveis da cromogranina A salivar dos cães após 1 hora da primeira coleta.

A duração média do procedimento de banho e tosa é de 45 minutos, o que reforça a ideia de esgotamento do conteúdo proteico dos grânulos secretórios quando da coleta pós-banho.

Após analisarmos os resultados e constataremos que os níveis de cromogranina A salivar diminuíram após o banho, uma das hipóteses foi a de que pesquisadores apontavam que o pânico ativa intensamente o eixo SAM e pouco interfere no eixo HPA, o que poderia explicar os altos níveis de cromogranina A salivar no pré-banho, por conta do animal não saber o que está por vir e,

provavelmente se acostumar ao longo do procedimento, diminuindo assim os níveis pós-banho (GRAEFF, 2007).

Além de termos descartado essa hipótese frente aos trabalhos de Amsterdam et al. (1969) e Castle et al. (1972), o volume de saliva pós-banho foi significativamente menor que o pré-banho, indicando que o eixo SAM encontrava-se ainda ativo.

Alguns estudos feitos em humanos também mostram que a cromogranina A diminui rapidamente após cessado o estímulo estressor, tal como dirigir um carro, apresentações orais e barulho (NAKANE et al., 1998; MIYAKAWA et al., 2006).

No estudo de Miyakawa et al. (2006) observou-se as diferenças individuais nas mudanças nos níveis de cromogranina A salivar em humanos frente ao barulho. Das 20 pessoas avaliadas, 06 aumentaram os níveis durante o barulho e mantiveram até 15 minutos após, sendo classificados como grupo de alta sensibilidade; 10 pessoas aumentaram os níveis durante o barulho e diminuíram imediatamente após, sendo classificadas como grupo de média sensibilidade; 04 pessoas não aumentaram os níveis nem durante, nem após o estímulo, sendo classificadas como grupo de baixa sensibilidade.

Em nosso trabalho observamos essa mesma diferença individual. Dos 33 animais estudados, 66,6% apresentaram diminuição da cromogranina A salivar após o banho, 21,2 % apresentaram um aumento e 12,2 % não tiveram mudanças significativas em seus níveis, reforçando o padrão de resposta individual dos animais frente a situações estressoras.

Essa diferença individual na resposta ao estresse observada tanto no trabalho de Miyakawa et al. (2006) como em nosso trabalho corrobora com a tese de diversos autores de que diferentes tipos de respostas biológicas são utilizadas pelo indivíduo e que a resposta ao mesmo estressor varia entre eles (CHROUSOS; GOLD, 1992; MOBERG; MENCH, 2001; MCCARTY; PACAK, 2007).

Tanto a cromogranina A como o cortisol apresentam-se aumentados frente a estressores físicos e psicológicos, porém diversos estudos apontam que a cromogranina A tem seus níveis aumentados principalmente frente a estressores psicológicos e o cortisol frente a estressores físicos (NAKANE et al., 1998; TAKATSUJI et al., 2008; GALLINA et al., 2011).

Em um ambiente de banho e tosa são encontrados diversos tipos de estressores, físicos como psicológicos, atuando tanto isoladamente como em

conjunto, o que impossibilita afirmar o que foi colocado por outros autores anteriormente. Esta diferença entre os tipos de estressores podem ser melhor avaliadas a partir do comportamento do animal, o que será discutido mais a frente.

Correlação entre os níveis de cortisol e cromogranina A salivares

De acordo com a análise estatística, uma correlação negativa muito fraca foi observada entre os analitos, ou seja, enquanto a cromogranina A salivar diminuía, o cortisol salivar aumentava, porém essa correlação não foi estatisticamente significativa.

Neste estudo observamos que os níveis de cromogranina A salivar aumentaram primeiro que os de cortisol salivar, o que corrobora com o encontrado na literatura, onde os níveis de cromogranina A aumentam antes que o do cortisol (KANNO et al., 1999).

Cortisol e cromogranina A salivares entre os estabelecimento A e B

Não foi observada nenhuma diferença estatística entre as análises dos estabelecimentos A e B, o que nos indica que independente do estabelecimento, os animais sofrem estresse.

A estrutura dos dois estabelecimentos, a conduta dos funcionários e os equipamentos e instrumentos utilizados são semelhantes, reforçando a tese de que o procedimento de banho e tosa como um todo é um agente estressor.

A estrutura e equipamentos utilizados pelos dois estabelecimentos serão discutidos mais a frente.

Cortisol e cromogranina A salivares e raça

Como abordado anteriormente, as raças com maior incidência no trabalho foram Shih-tzu e Lhasa-apso, portanto ao compararmos os níveis de cortisol e cromogranina A salivares com raças dividimos em 3 grupos: Shih-tzu, Lhasa-apso e Outros.

Os testes mostraram não haver diferença significativa nos níveis de cortisol salivar entre os 3 grupos de raças. Esse resultado corrobora com outros estudos que

também mostram não haver diferença nas concentrações de cortisol entre as raças (COPPOLA; GRANDIN; ENNS, 2006; BENNETT; HAYSSEN, 2010).

Em relação às concentrações de cromogranina A salivar, os testes mostraram uma diferença significativa entre os tempos para o grupo Outros em relação à raça Shih-tzu. As concentrações de cromogranina A salivar na raça Shih-tzu são menores que no grupo Outros em 68% no pré-banho e 57% no pós-banho. Também podemos destacar que os valores de cromogranina A salivar pré e pós-banho para os cães da raça Shih-tzu se mantiveram bem próximos.

Não podemos afirmar o porquê da raça Shih-tzu ter as concentrações de cromogranina A salivar com valores próximos no pré e pós-banho, como também mais baixas que as outras raças, já que não há estudos que comprovem alguma relação dos níveis de cromogranina A com a raça dos cães.

A priori, cães da raça Shih-tzu são animais que apresentam um grau médio de agressividade e reatividade, sendo mais calmos que cães da raça Yorkshire, Poodle, Dachshund e Cocker Spaniel Inglês (NOTARI; GOODWIN, 2007).

Para que possamos chegar a alguma conclusão sobre o comportamento do eixo SAM em cães da raça Shih-tzu, se faz necessário estudos com estímulos estressores isolados e com animais de diversas raças.

Cortisol e cromogranina A salivares e idade

Em relação à idade dos animais, pode-se observar que não houve diferença significativa com o cortisol e a cromogranina A salivares. Os resultados observados no cortisol salivar corroboram com um estudo realizado em um abrigo de cães nos Estados Unidos (COPPOLA; GRANDIN; ENNS, 2006). Ainda não há estudos que comprovem alguma relação dos níveis de cromogranina A com a idade dos cães.

Cortisol e cromogranina A salivares e sexo

Como podemos observar, não houve diferenças significativas entre os sexos, tanto pra o cortisol salivar como para a cromogranina A salivar. Os resultados para cromogranina A salivar corroboram com os apresentados por Kanai et al. (2008) onde também não foi observado diferenças entre os sexos. Já em relação ao cortisol

salivar, estudos mostram que também não há diferenças entre os sexos (COPPOLA; GRANDIN; ENNS, 2006; BENNETT; HAYSEN, 2010).

Em um trabalho realizado por Medeiros (2007) para a aferição dos níveis de cortisol plasmáticos em cães da raça poodle durante o banho e tosa, também não mostrou diferença entre o sexo dos animais.

Correlação entre cortisol e cromogranina A salivares com os parâmetros fisiológicos

As correlações observadas com relação ao cortisol salivar foram fracas ou até mesmo ausentes. Quanto à frequência cardíaca ter uma baixa correlação com o cortisol salivar, esta também foi observada no estudo de Beerda et al. (1998), onde não houve correlação entre as duas variáveis, creditando-se o fato a grande variação individual de resposta ao estresse.

A correlação constante entre o cortisol salivar e a temperatura corporal neste estudo indicou que, independente das variações do cortisol salivar, a temperatura se manteve estável durante o banho e tosa.

As correlações observadas com relação à cromogranina A salivar foram ainda mais fracas que as de cortisol salivar. Neste estudo observamos que nem sempre os animais que apresentam altas concentrações de cromogranina A salivar terão a frequência cardíaca alta.

Devido ao pequeno número de trabalhos a respeito da cromogranina A em cães e até mesmo em outras espécies, não há dados suficientes para discussão, o que abre as portas para a realização de futuros trabalhos correlacionando os níveis da proteína a parâmetros fisiológicos.

Cortisol e cromogranina A salivares e frequência do banho

A frequência de banho observada neste trabalho foi de 1 vez por semana, a cada 15 dias e uma vez por mês e esporadicamente, conforme o questionário aplicado aos proprietários.

Segundo os próprios médicos veterinários e funcionários dos estabelecimentos, geralmente os cães que comparecem ao banho e tosa uma vez por semana são os cães de pequeno porte e que apresentam pelagem abundante

de difícil manejo. Este dado pôde ser confirmado pelo nosso estudo, onde todos os animais banhados uma vez por semana apresentavam estas características.

Quando comparamos a frequência do banho e tosa com os níveis de cortisol salivar, observamos não haver diferenças entre os grupos. No estudo realizado por Medeiros (2007), também foi observado não haver diferença entre o cortisol plasmático dos cães nos dois dias de avaliação.

Em relação à cromogranina A salivar houve uma diferença significativa em relação à frequência de 1 vez por semana, no pré-banho e principalmente no pós-banho, onde os níveis da proteína nesse grupo foram menores que no restante.

Um fato a se considerar em relação a isto é que os cães que frequentam o banho e tosa 1 vez por semana são em sua grande maioria da raça Shih-tzu, o que pode ter influenciado o resultado, uma vez que já vimos anteriormente aqui que estes cães apresentam níveis de cromogranina A salivar mais baixos e estáveis que os cães das outras raças.

Importante frisar que, como este é o primeiro estudo que envolve o estresse no banho e tosa com diversas raças de cães, se faz necessário um estudo mais aprofundado para verificar se realmente há diferença entre os tempos, dado que dos 33 cães avaliados neste estudo, apenas 19 responderam a esta pergunta no questionário e por conta dos cães da raça Shih-tzu.

Cortisol e cromogranina A salivares e comportamento (C-BARQ©)

Conforme observado nos resultados, nenhum dos comportamentos (agressividade, medo, separação e treinamento) apresentou relação com os níveis de cortisol e cromogranina A salivares, o que difere do trabalho feito por Medeiros (2007) e Ramos et al. (2006), onde os animais considerados agressivos também apresentaram agressividade durante o banho e tosa.

Ainda no trabalho de Medeiros (2007), foi observada uma relação entre os níveis de cortisol com a agressividade durante o banho e tosa, pois alguns animais foram agressivos com o banhista e tosador. Em nosso trabalho nenhum cão, inclusive os que apresentaram sinais de agressividade no C-BARQ©, apresentou qualquer sinal de agressividade perante os funcionários ou até mesmo de nossa equipe que coletava os materiais biológicos.

Também devemos levar em conta que a agressividade relatada no C-BARQ® foi informada pelo proprietário, o que pode levar a um resultado subjetivo, uma vez que alguns proprietários não reconhecem ou reconhecem erroneamente um sinal de agressividade.

Segundo Koolhaas et al. (1999b) animais agressivos (proativos) apresentam níveis de cromogranina A aumentados e que quando disso, os níveis de cortisol são baixos.

Em nosso trabalho, dos 33 cães avaliados apenas 9 apresentaram níveis muito elevados de cromogranina A salivar, acima da média. Dentre esses 9 animais, 5 apresentaram níveis de cortisol salivar abaixo da média e ainda abaixo dos níveis basais descritos em literatura. Ainda assim, quando comparados com a agressividade obtida pelo C-BARQ®, dos 5 animais, apenas 3 apresentavam tal característica, o que inviabiliza uma análise confiável para se testar a teoria de Koolhaas et al. (1999b) neste estudo.

Os dados observados neste trabalho vão contra os observados no trabalho de Medeiros (2007), porém os cães deste trabalho eram em sua totalidade poodles, enquanto que em nosso trabalho dos 33 animais, apenas 2 eram poodles.

Notari e Goodwin (2007) descrevem os cães da raça poodle como de média agressividade e alta reatividade e imaturidade. Segundo Lambert (2008), os poodles toys e miniatura, que são os mais observados no Brasil, apresentam uma tendência de serem extremamente sensíveis e excitados, o que pode torná-los nervosos e mal-humorados.

O fato de Medeiros (2007) ter observado agressividade nos cães durante o banho e tosa pode ser creditado ao fato de todos serem poodles e apresentarem as características descrita acima. Sendo assim, inviabiliza a comparação com nosso estudo.

Comportamento durante o procedimento de banho e tosa

Ao longo do trabalho observamos as alterações nas concentrações salivares de cortisol e cromogranina A e nos parâmetros fisiológicos dos animais e podemos concluir que o ambiente de banho e tosa traz um grande desconforto para o animal.

Haugh (2004) descreve em sua dissertação sobre o comportamento de cães filhotes da raça Beagle, cães relaxados como sentados ou deitados, com seus

músculos relaxados, corpo sem apresentar tremores, cauda abaixada e orelhas levantadas.

Como já discutido anteriormente, o ambiente de banho e tosa apresenta diversos agentes estressores, desde o ambiente em si, até a presença dos funcionários e de outros animais.

O desconforto dos animais começa a partir do momento da sua chegada ao estabelecimento, onde observamos que muitos animais apresentavam dificuldade para entrar no estabelecimento, tendo que ser arrastados pela coleira muitas vezes; outra parte dos animais chegavam no colo do proprietário, alguns por comodidade, mas outros por facilidade pois sabiam que seus animais não entrariam voluntariamente.

Estes dados corroboram com os observados por Stanford (1981) e Döring et al. (2009), onde muitos cães também precisavam ser carregados no colo para que conseguissem entrar na clínica veterinária.

Ainda no trabalho de Döring et al. (2009), 60% dos animais levados ao veterinário apresentavam sinais de medo e submissão, fortalecendo ainda mais a ideia de que os animais se sentem incomodados nestes estabelecimentos.

Os animais percebem que todas as vezes que entram em um estabelecimento veterinário algo desagradável ao seu ponto de vista acontece, seja para um banho e tosa, consultas com aplicações de medicamentos que lhe causam dor, entre outros fatores.

A aversão da maioria dos cães pelos consultórios veterinários foi relatada por Perego, Proverbio e Spada (2014) em seu estudo sobre a frequência cardíaca e o cortisol sérico de cães na sala de espera para o atendimento. Neste estudo, os pesquisadores observaram que os níveis de cortisol sérico e a frequência cardíaca desses cães eram maiores que o grupo controle, corroborando com o fato que por si só o ambiente veterinário é um agente estressor para os animais.

Quando realizávamos as coletas de saliva nos animais evitávamos colocar estes sobre a mesa de procedimento, uma vez que os sinais de medo e submissão ficam mais evidentes, segundo Döring et al. (2009), podendo assim interferir em nossos resultados.

Segundo Hennessy et al. (1998) os níveis de cortisol plasmáticos diminuem em 20 minutos após a interação com o animal. Neste estudo, diversos cães interagiram com pessoas do sexo masculino e feminino, sendo acariciados e

recebendo estímulos através da fala do manipulador. A redução do cortisol após a interação foi expressiva, o que poderia ser extrapolado para o ambiente de banho e tosa, na tentativa de diminuir o estresse nestes animais.

Com base nos dados em literatura e nos comportamentos observados durante os procedimentos, podemos constatar que os animais apresentam sinais típicos de estresse durante o banho e tosa, porém temos um aumento desses comportamentos durante a secagem.

Dos nove comportamentos negativos observados durante todo o procedimento de banho e tosa apenas dois diminuíram durante o momento da secagem, sendo eles os choros e as orelhas para trás, mas ainda assim sem apresentar diferença significativa entre os tempos. Os comportamentos que ficaram mais evidentes e que apresentaram diferença significativa entre os dois momentos foram os membros rígidos e a lambedura do plano nasal.

A lambedura excessiva do plano nasal está associada ao desconforto e ansiedade nos cães, mas em alguns casos pode estar relacionado ao fato de umedecer o focinho quando este se encontra muito ressecado. Durante a secagem é fato que o vento emitido pelo soprador e secador resseca tanto a boca quanto o focinho do animal, porém este comportamento foi percebido mesmo quando o aparelho estava longe da cabeça do cão.

O aumento dos sinais típicos de estresse durante a secagem pode ser creditado ao uso do soprador, um aparelho utilizado para retirar o excesso de água dos pelos dos animais e que emiti um som muito alto e produz rajadas de vento muito fortes.

Cães são muito sensíveis ao som, conseguindo detectá-los quatro vezes mais distantes que os seres humanos. Desta forma, frente a sons extremamente altos, como o de tempestades e fogos de artifício, os cães apresentam sinais típicos de estresse como tremores no corpo, cauda entre as pernas, tentativas de se esconderem, entre outros (ENGELAND; MILLER; GANN, 1990; BEERDA et al., 1997; DRESCHER; GRANGER, 2005).

Em um trabalho realizado por Dreschel e Granger (2005) foi observado que os níveis de cortisol dos cães aumentaram em 207% frente ao barulho de uma tempestade simulada, não ocorrendo diferenças entre os sexos.

Durante a realização do experimento tivemos a oportunidade de observar alguns banhos em gatos, mas como estes não eram o foco do trabalho, não foram

coletados dados e nem material biológico, porém podemos destacar alguns pontos interessantes. O momento mais estressante para os gatos durante o banho e tosa é durante a secagem devido ao uso do soprador. Ficou evidente que, só do fato de se ligar o soprador, os gatos se tornam reativos e muitas vezes agressivos, tendo que desligar o aparelho e continuar o trabalho de secagem com o secador ou mesmo apenas com a toalha.

Para minimizar o problema do uso do soprador em cães, observamos que ao retirar o bocal do aparelho, a pressão do vento e o som diminuem. Para o estabelecimento, a retirada do bocal é um ponto negativo, pois aumentará o tempo de secagem do animal, gerando mais custos. Caso, mesmo retirando o bocal do soprador, o animal continuar a se estressar, o uso do soprador é interrompido e o procedimento deve ser seguido apenas utilizando-se uma toalha e o secador, em uma temperatura agradável.

Durante o nosso estudo observamos outros pontos críticos no estabelecimento de banho e tosa. Além do barulho e do ambiente em si, por ser estranho ao animal, a presença de outros animais também chamou atenção.

Percebemos que quando um animal encontrava-se agitado no recinto, latindo incontrolavelmente, este instigava outros a latirem também, principalmente entre os animais que se encontravam dentro das gaiolas, na espera para serem banhados ou para a chegada de seus donos após o banho.

Muitos animais ficavam observando o que acontecia ao seu redor, principalmente quando havia algum animal solto, andando livremente pelo recinto, o que deixava muitos animais com expressão tensa e atenta, portanto jamais deixar animais livres no recinto.

Pontos críticos nos estabelecimentos A e B

A seguir serão elencados os pontos críticos no estabelecimento com base nas variáveis observadas e descritas nos resultados e que devem ser levadas em consideração a fim de manter a integridade física do animal e dos funcionários.

Equipamentos e instrumentos de banho e secagem

Como já abordado anteriormente, o soprador é um dos principais agentes estressores do banho e tosa e deve ser utilizado com cautela e quando necessário retirado o seu bocal ou substituído pelo secador e/ou toalha. A caixa acústica utilizada pelo estabelecimento A diminui a intensidade do som do soprador, o que poderia ser acatado por todos os estabelecimentos.

Cuidado com a temperatura do secador para evitar queimaduras e até problemas oculares como uma úlcera de córnea. Nunca deixar o secador direcionado para a cabeça do animal, como também deixa-lo muito tempo em contato com uma mesma região do corpo, a fim de evitar tais lesões.

As toalhas utilizadas pelo estabelecimento devem ser únicas para cada cão, evitando assim que doenças, principalmente dermatológicas sejam transmitidas. O mercado já oferece serviços de esterilização das toalhas, que são acomodadas em pacotes individuais e lacrados, sendo recolhidas semanalmente, proporcionando ainda mais higiene nos procedimentos de banho e tosa. O mesmo cuidado deve-se ter com todos os instrumentais, evitando utilizá-los entre animais que apresentem alguma dermatopatia.

Banheiras

Atenção à temperatura da água para não causar hipotermia nos animais e nem queimaduras. Antes de colocar os animais em contato com a água, verificar se esta se encontra em uma temperatura agradável.

Cuidado com ralos nos quais os cães podem prender dígitos e/ou lesionar coxins. Ralos sem tampa oferecem um risco maior, uma vez que os animais podem prender mãos ou pés.

Animais muito agitados durante o banho, se presos por coleira fixa à parede, podem escorregar, na tentativa de sair da banheira e sofrer traumatismos.

Mesas de procedimentos

Muitas mesas possuem uma haste lateral, na qual está acoplada uma coleira. A haste, por si só, já representa um risco para animais agitados, que, não raro,

chocam-se contra a haste. Animais presos por essa coleira podem fazer movimentos bruscos ou até mesmo saltar da mesa - o que provocaria graves lesões (como enforcamento, lesões contundentes). Dependendo do tamanho do animal e do peso da mesa, ao pular o cão pode virá-la, comprometendo ainda a integridade física do funcionário. Se possível, a contenção do animal deve ser feita por uma segunda pessoa.

Tomadas e fios elétricos devem ficar fora do alcance dos animais evitando assim lesões decorrentes de choques elétricos, tanto para o animal quanto para o funcionário que estiver manipulando-o.

Cuidado com os instrumentos de escovação e tosa, pois em sua maioria são pérfuro-cortantes e se deixados livres sobre a mesa podem oferecer risco a integridade física do animal. Se possível utilizar uma mesa de apoio sobre a qual os funcionários poderiam apoiar os instrumentos.

Gaiolas

Conferir a integridade das grades das gaiolas onde os animais são colocados antes e após o banho, principalmente se o trinco que as fecha esteja funcionando, para evitar que animais pulem e acabem se ferindo e ferindo outros animais.

Cuidado com coleiras do tipo enforcador, uma vez que a guia pode enroscar nas grades da gaiola e, se tracionada, pode provocar lesões no animal. A guia costuma ser mantida na coleira por facilitar a retirada do cão da gaiola, mas, se o animal for dócil, recomenda-se retirá-la.

Cuidado no momento de colocar o animal na gaiola, já que o cão pode estar com a musculatura de membros contraída, devido ao estresse e, se colocado bruscamente, há risco de lesões musculoesqueléticas. Além disso, deve-se considerar o risco de lesão em dígitos e coxins.

Separar os boxes das gaiolas entre os animais recém-chegados e os que já foram higienizados, evitando assim a transferência de sujidades e odores provenientes dos não higienizados.

Ventilação

Todos os ambientes devem ser ventilados, principalmente em dias quentes. Sugere-se a utilização de ar-condicionado, uma vez que o vento proveniente do secador faz com que os pelos retirados do animal fiquem em suspensão no ar, podendo gerar alergias e desconforto para os funcionários.

Atentar para as portas de entrada e saída da sala de banho e tosa. Estas devem estar fechadas ou, caso permaneçam abertas, devem ter portões que evitem que o animal escape.

Conduta dos funcionários e médicos veterinários

Um cadastro com histórico médico do animal deve ser realizado, independente deste ser cliente da clínica veterinária ou não e o médico veterinário responsável pelo estabelecimento deve orientar os funcionários acerca do histórico do animal se for pertinente (ex.: pacientes com deficiências cardiorrespiratórias; histórico de traumatismo e lesões de maneira geral; doenças neurológicas). Uma forma prática de acesso a essas informações seria adicionar os dados de cada animal à planilha/agenda utilizada pelos funcionários do estabelecimento.

Deve-se observar o estado geral do cão antes de qualquer procedimento, nível de consciência e frequência respiratória, por exemplo, são parâmetros passíveis de serem avaliados por inspeção direta; logo, não exigem contenção do animal e podem ser observados pelos próprios funcionários. Para tanto, se faz necessário o treinamento correto dos funcionários, para que estes estejam atentos a qualquer sinal demonstrado pelo animal. No trabalho feito por Maria et. al (2013) foi observado que os animais vinham a óbito minutos após o início dos procedimentos de banho e tosa apresentando, na maioria dos casos, sinais de intensa agitação, aumento da frequência cardíaca e respiratória, cianose e desmaios. Com o treinamento correto, funcionários podem reconhecer esses sinais, parando imediatamente o procedimento e alertando o médico veterinário.

Alertar os proprietários da duração do procedimento e frisar a importância da retirada do animal logo em seguida, pois o mesmo fica a espera dentro das gaiolas na sala de banho e tosa, o que pode contribuir ainda mais para o estresse do

animal. Se possível, ao término do procedimento, ligar para o proprietário e avisá-lo que o animal já está a sua espera.

Frente aos pontos críticos que um estabelecimento de banho e tosa pode apresentar, é indispensável a presença de um responsável técnico médico veterinário no estabelecimento e adequada qualificação dos funcionários, para que se possa reduzir significativamente o número de acidentes e óbitos durante tais procedimentos.

A Resolução nº 878, de 15 de fevereiro de 2008, do Conselho Federal de Medicina Veterinária lembra que em um ambiente de banho e tosa, a manipulação equivocada de substâncias e o manejo incorreto dos animais pode acarretar em reações alérgicas, hipóxias e arritmias, fraturas e outros danos à saúde dos animais e que os tratamentos, equipamentos e drogas utilizados no atendimento de um animal são de competência e uso privativos do médico veterinário (BRASÍLIA, 2008).

7 CONCLUSÃO

O aumento nos níveis salivares de cortisol e cromogranina A aliados as alterações nos parâmetros cardíacos e respiratórios, como também a presença de *coping styles* demonstrou que os procedimentos de banho e tosa geram estresse a grande maioria dos animais.

O uso do cortisol salivar como ferramenta para a avaliação de estresse se mostrou muito eficaz nos procedimentos de banho e tosa, pois conseguiu mostrar a evolução das suas concentrações ao longo do procedimento, comprovando a tese inicial de que os procedimentos de banho e tosa estressam a maioria dos animais.

A cromogranina A salivar como marcador de estresse no banho e tosa demonstrou ser eficaz apenas para a avaliação do estresse no pré-banho. Já para o pós-banho, a proteína não se mostrou viável, pois não foi possível quantificar, através de suas concentrações, a atividade do eixo SAM. Por conta do pouco conhecimento a cerca da cromogranina A salivar em cães, ainda se faz necessários estudos para firmá-la como marcador ideal de estresse hiperagudo em situações com duração e características semelhante aos procedimentos de banho e tosa.

Diferentes tipos de respostas biológicas são utilizadas pelo animal frente ao estímulo estressor e a forma de combatê-los varia entre eles, porém observamos que quando do estresse provocado pelo banho e tosa, a grande maioria dos cães, independente de raça, sexo e idade demonstraram desconforto em tais procedimentos.

A utilização dos *coping styles* se mostrou uma ferramenta extremamente eficaz na detecção do estresse durante o banho e tosa, principalmente para distinguir em quais situações os animais se mostram mais incomodados, que neste caso é durante a secagem. A observação do comportamento dos cães durante todo o procedimento de banho e tosa nos estabelecimento A e B, permite sugerir que os animais que ali estavam são reativos, pois apresentaram os sinais característicos do *coping* reativo e não apresentaram em nenhum momento sinais de agressividade.

A estrutura de um estabelecimento de banho e tosa pode apresentar pontos críticos que causem danos à saúde do animal, portanto se faz necessária uma inspeção periódica no estabelecimento a fim de se diminuir tais pontos.

7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de um médico veterinário no estabelecimento e o correto treinamento dos funcionários garante uma maior qualidade na prestação dos serviços de banho e tosa, prevenindo e atuando de forma eficiente e eficaz em quaisquer intercorrências que possam surgir.

REFERÊNCIAS

- ABE, M. C. **Brasileiros gastaram R\$ 16,7 bilhões com bichos de estimação em 2014**. Disponível em: <<http://petmoney.blogosfera.uol.com.br/2015/05/05/brasileiros-gastaram-r-167-bilhoes-com-bichos-de-estimacao-em-2014/>>. Acesso em: 15 maio. 2015.
- AKIYOSHI, H.; AOKI, M.; SHIMADA, T.; NODA, K.; KUMAGAI, D.; SALEH, N.; SUGII, S.; OHASHI, F. Measurement of plasma chromogranin A concentrations for assessment of stress responses in dogs with insulin-induced hypoglycemia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 10, p. 1830–1835, 2005.
- ALLEN, A. P.; KENNEDY, P. J.; CRYAN, J. F.; DINAN, T. G.; CLARKE, G. Biological and psychological markers of stress in humans: focus on the trier social stress test. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 38, p. 94–124, 2014.
- AMENÁBAR, J. M. **Níveis de cortisol salivar, grau de estresse e de ansiedade em indivíduos com síndrome de ardência bucal**. 2006. Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul, 2006.
- AMSTERDAM, A.; OHAD, I.; SCHRAMM, M. Dynamic changes in the ultrastructure of the acinar cell of the rat parotid gland during the secretory cycle. **Journal of Cell Biology**, v. 41, n. 3, p. 753–773, 1969.
- 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, n. 3-4, p. 131–142, 2010.
- AURICH, J.; WULF, M.; ILLE, N.; ERBER, R.; VON LEWINSKI, M.; PALME, R.; AURICH, C. Effects of season, age, sex and housing on salivary cortisol concentrations in horses. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 52C, p. 11–16, 2015.
- BEAVER, B. V. História do desenvolvimento canino. In: BEAVER, B. V. (Ed.). **Comportamento canino: um guia para veterinários**. São Paulo: Roca, 2001. p. 3.
- 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**, v. 52, n. 3-4, p. 307–319, 1997.
- 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.; JANSSEN, N. S.; 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.

BENARDE, M. A.; FABIAN, F. W.; ROSEN, S.; HOPPERT, C. A.; HUNT, H. R. A Method for the Collection of Large Quantities of Rat Saliva. **Journal of Dental Research**, v. 35, n. 2, p. 326–327, 1956.

BENNETT, A.; HAYSSEN, V. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. **Domestic animal endocrinology**, v. 39, n. 3, p. 171–180, 2010.

BERGAMASCO, L.; OSELLA, M. C.; SAVARINO, P.; LAROSA, G.; OZELLA, L.; MANASSERO, M.; BADINO, P.; ODORE, R.; BARBERO, R.; RE, G. Heart rate variability and saliva cortisol assessment in shelter dog: Human-animal interaction effects. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 125, n. 1-2, p. 56–68, 2010.

BERTOLONI, W.; SILVEIRA, E. T. F.; LUDTKE, C. B.; ANDRADE, J. C. de. Avaliação de diferentes híbridos suínos submetidos à insensibilização elétrica e gasosa (CO₂). Parte 1: mensuração de indicadores sanguíneos de estresse. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 564–570, 2006.

BODNARIU, A. Indicators of Stress and Stress Assessment in Dogs. **Lucrari Stiintifice - Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara**, v. 41, p. 20–26, 2008.

BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 349–356, 2006.

BRASÍLIA. (Estado). Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução nº 878, de 15 de fevereiro de 2008. Regulamenta a fiscalização de pessoas jurídicas cujas atividades compreendam a prestação de serviços de estética, banho e tosa e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 26 fev. 2008. Sec. 1, p. 100.

BROCK, J. C. Origins of the dog: domestication and early history. In: SERPELL, J. (Ed.). **The domestic dog's evolution, behaviour, and interactions with people**. New York: Cambridge University Press, 1995. p. 10.

BRYAN, H. M.; ADAMS, A. G.; INVIK, R. M.; WYNNE-EDWARDS, K. E.; SMITS, J. E. G. Hair as a meaningful measure of baseline cortisol levels over time in dogs. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 52, n. 2, p. 189–96, 2013.

CANNON, W. B. Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. **Southern Medical Journal**, v. 22, n. 9, p. 870, 1929.

CARERE, C.; GROOTHUIS, T. G. G.; MÖSTL, E.; DAAN, S.; KOOLHAAS, J. M. Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities: daily rhythm and the response to social stress. **Hormones and Behavior**, v. 43, n. 5, p. 540–548, 2003.

CARMO, T. L. L. do; AMARAL, R. D. S.; ROSAS, F. C. W.; D'AFFONSÊCA NETO, J. A.; REISFELD, L.; SILVA, V. M. F. da. Changes in the Blood Parameters of the Amazonian Manatee (*Trichechus Inunguis*) after Long-Distance Transportation. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 35, n. 4, p. 591–594, 2013.

CASTLE, D.; CASTLE, A. Intracellular transport and secretion of salivary proteins. **Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists**, v. 9, n. 1, p. 4–22, 1998.

CASTLE, J. D.; JAMIESON, J. D.; PALADE, G. E. Radioautographic Analysis of the Secretory Srrabbit. **The Journal of Cell Biology**, v. 53, p. 290–311, 1972.

CHAUNCEY, H. H.; HENRIQUES, B. L.; TANZER, J. M. Comparative enzyme activity of saliva from the sheep, hog, dog, rabbit, rat, and human. **Archives of Oral Biology**, v. 8, n. 5, p. 615–627, 1963.

CHROUSOS, G. P.; GOLD, P. W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, v. 267, n. 9, p. 1244–52, 1992.

COPPENS, C. M.; DE BOER, S. F.; KOOLHAAS, J. M. Coping styles and behavioural flexibility: towards underlying mechanisms. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 365, n. 1560, p. 4021–8, 2010.

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

CRONIN, G. M.; HEMSWORTH, P. H.; BARNETT, J. L.; JONGMAN, E. C.; NEWMAN, E. A.; MCCAULEY, I. An anti-barking muzzle for dogs and its short-term effects on behaviour and saliva cortisol concentrations. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 83, n. 3, p. 215–226, 2003.

DE ALMEIDA, P. D. V.; GRÉGIO, A. M. T.; MACHADO, M. A. N.; DE LIMA, A. A. S.; AZEVEDO, L. R. Saliva composition and functions: a comprehensive review. **The journal of contemporary dental practice**, v. 9, n. 3, p. 72–80, 2008.

DICKERSON, S. S.; KEMENY, M. E. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. **Psychological Bulletin**, v. 130, n. 3, p. 355–391, 2004.

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

DOSS, J. C.; GRÖNE, A.; CAPEN, C. C.; ROSOL, T. J. Immunohistochemical localization of chromogranin A in endocrine tissues and endocrine tumors of dogs. **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 4, p. 312–315, 1998.

DRESCHEL, N. A.; GRANGER, D. A. Physiological and behavioral reactivity to stress in thunderstorm-phobic dogs and their caregivers. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 95, n. 3-4, p. 153–168, 2005.

DRESCHEL, N. A.; GRANGER, D. A. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 1, p. 163–168, 2009a.

DRESCHEL, N. A.; GRANGER, D. A. Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. **Hormones and Behavior**, v. 55, n. 1, p. 163–168, 2009b.

DUFFY, D. L.; HSU, Y.; SERPELL, J. A. Breed differences in canine aggression. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, n. 3-4, p. 441–460, 2008.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

EILER, H. Endocrine glands. In: REECE, W. O. (Ed.). **Dukes' physiology of domestic animals**. Ithaca: Cornell University Press, 2004. p. 621–669.

EL-BAHR, S. M.; KAHLBACHER, H.; RAUSCH, W. D.; PALME, R. G. Excretion of catecholamines (adrenaline and noradrenaline) in domestic livestock. **Wiener Tierärztliche Monatsschrift**, v. 92, n. 9, p. 207–213, 2005.

EMMELIN, N.; YOUNG, J. A.; GARRETT, J. R. Nervous Control of Mammalian Salivary Glands [and Discussion]. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: biological sciences**, v. 296, n. 1080, p. 27–35, 1981.

ENGELAND, W. C.; MILLER, P.; GANN, D. S. Pituitary-adrenal and adrenomedullary responses to noise in awake dogs. **The American journal of physiology**, v. 258, n. 3 Pt 2, p. R672–7, 1990.

ESCRIBANO, D.; GUTIÉRREZ, A. M.; FUENTES-RUBIO, M.; CERÓN, J. J. Saliva chromogranin A in growing pigs: a study of circadian patterns during daytime and stability under different storage conditions. **Veterinary Journal**, v. 199, n. 3, p. 355–9, 2014.

ESCRIBANO, D.; SOLER, L.; GUTIÉRREZ, A. M.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CERÓN, J. J. Measurement of chromogranin A in porcine saliva: validation of a time-resolved immunofluorometric assay and evaluation of its application as a marker of acute stress. **Animal**, v. 7, n. 4, p. 640–7, 2013.

FARCA, A. M.; CAVANA, P.; BADINO, P.; BARBERO, R.; ODORE, R.; POLLICINO, P. Measurement of faecal corticoid metabolites in domestic dogs. **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 148, n. 12, p. 649–55, 2006.

FULKERSON, W. J.; TANG, B. Y. Ultradian and circadian rhythms in the plasma concentration of cortisol in sheep. **The Journal of Endocrinology**, v. 81, n. 1, p. 135–41, 1979.

GALEANDRO, L.; SIEBER-RUCKSTUHL, N. S.; RIOND, B.; HARTNACK, S.; HOFMANN-LEHMANN, R.; REUSCH, C. E.; BORETTI, F. S. Urinary corticoid concentrations measured by 5 different immunoassays and gas chromatography-mass spectrometry in healthy dogs and dogs with hypercortisolism at home and in the hospital. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 5, p. 1433–41, 2014.

GALLINA, S.; DI MAURO, M.; D'AMICO, M. A.; D'ANGELO, E.; SABLONE, A.; DI FONSO, A.; BASCELLI, A.; IZZICUPO, P.; DI BALDASSARRE, A. Salivary chromogranin A, but not amylase, correlates with cardiovascular parameters during high-intensity exercise. **Clinical Endocrinology**, v. 75, n. 6, p. 747–752, 2011.

GOLDSTEIN, D. S. Sympathetic nervous system. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 697–704.

GÓMEZ, A.; JEWELL, E.; WALKER, S. L.; BROWN, J. L. Use of salivary steroid analyses to assess ovarian cycles in an Indian rhinoceros at the National Zoological Park. **Zoo Biology**, v. 23, n. 6, p. 501–512, 2004.

GONG, S.; MIAO, Y.-L.; JIAO, G.-Z.; SUN, M.-J.; LI, H.; LIN, J.; LUO, M.-J.; TAN, J.-H. Dynamics and correlation of serum cortisol and corticosterone under different physiological or stressful conditions in mice. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0117503, 2015.

GRAEFF, F. G. Ansiedade , pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, n. 55 16, p. 3–6, 2007.

GREENSPAN, F. S. **Endocrinologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Book Company, 2006.

GUTIÉRREZ, A. M.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; ECKERSALL, P. D.; CERÓN, J. J. C-reactive protein quantification in porcine saliva: A minimally invasive test for pig health monitoring. **Veterinary Journal**, v. 181, n. 3, p. 261–265, 2009.

GUY, N. C.; LUESCHER, U. A.; DOHOO, S. E.; SPANGLER, E.; MILLER, J. B.; DOHOO, I. R.; BATE, L. A. Risk factors for dog bites to owners in a general veterinary caseload. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 74, n. 1, p. 29–42, 2001.

HAUGH, J. **Vergleichende untersuchungen zum verhalten von beaglewelpen aus hand- und mutteraufzucht**. Munich, Germany: Ludwig-Maximilians Universität, 2004.

HENNESSY, M. B.; T. WILLIAMS, M.; 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, n. 1, p. 63–77, 1998.

HENRY, J. B. Biological bases os the stress response. **Integrative Psychological and Behavioral Science**, v. 27, n. 1, p. 66–83, 1992.

HERDT, T. H. Fisiologia gastrointestinal e metabolismo. In: CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. (Ed.). **Tratado de fisiologia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 332–333.

HJEMDAHL, P. Cardiovascular system and stress. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 396–410.

HORVÁTH, Z.; IGYÁRTÓ, B. Z.; MAGYAR, A.; MIKLÓSI, Á. Three different coping styles in police dogs exposed to a short-term challenge. **Hormones and Behavior**, v. 52, n. 5, p. 621–630, 2007.

HOUP, K. A.; KENDRICK, K. M.; PARROTT, R. F.; DE LA RIVA, C. F. Catecholamine content of plasma and saliva in sheep exposed to psychological stress. **Hormone and Metabolic Research**, v. 20, n. 3, p. 189–90, 1988.

HSU, Y.; SERPELL, J. A. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 9, p. 1293–300, 2003.

HUMPHREY, S. P.; WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: normal composition, flow, and function. **The Journal of prosthetic dentistry**, v. 85, n. 2, p. 162–9, 2001.

IBGE. Fundação do instituto brasileiro de geografia e estatística. **Pesquisa nacional de saúde 2013**. Rio de Janeiro, 2015. p. 26.

IRVINE, C. H.; ALEXANDER, S. L. Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 11, n. 2, p. 227–38, 1994.

JENNINGS, J. R. Heart rate. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 274–278.

JOHNSTON, S. D.; MATHER, E. C. Canine plasma cortisol (hydrocortisone) measured by radioimmunoassay: clinical absence of diurnal variation and results of ACTH stimulation and dexamethasone suppression tests. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n. 11, p. 1766–70, 1978.

JORDÃO, C. **Setor pet tem faturamento recorde de R\$ 14,2 bi. Empresários traçam expansão**. 2013. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/saopaulo/2013/05/1283576-setor-pet-tem-faturamento-recorde-de-r-142-bi-empresarios-tracam-expansao.shtml>>. Acesso em: 6 mar. 2015.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Glândulas endócrinas. In: JUNQUEIRA, L. C. CARNEIRO, J. (Ed.). **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 390–414.

KANAI, K.; HINO, M.; HORI, Y.; NAKAO, R.; HOSHI, F.; ITOH, N.; HIGUCHI, S. Circadian variations in salivary chromogranin a concentrations during a 24-hour period in dogs. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, n. 4, p. 421–423, 2008.

KANNO, T.; ASADA, N.; YANASE, H.; IWANAGA, T.; OZAKI, T.; NISHIKAWA, Y.; IGUCHI, K.; MOCHIZUKI, T.; HOSHINO, M.; YANAIHARA, N. Salivary secretion of highly concentrated chromogranin a in response to noradrenaline and acetylcholine in isolated and perfused rat submandibular glands. **Experimental Physiology**, v. 84, n. 6, p. 1073–1083, 1999.

KENNEDY, B.; DILLON, E.; MILLS, P. J.; ZIEGLER, M. G. Catecholamines in human saliva. **Life Sciences**, v. 69, n. 1, p. 87–99, 2001.

KIM, T. W.; JEONG, J.-H.; HONG, S.-C. The Impact of Sleep and Circadian Disturbance on Hormones and Metabolism. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, p. 591729, 2015.

KLEIN, B. G.; CUNNINGHAM, J. G. Sistema nervoso autônomo e medula supra-renal. In: CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN, B. G. (Ed.). **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 135–144.

KOBELT, A. J.; HEMSWORTH, P. H.; BARNETT, J. L.; BUTLER, K. L. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 75, n. 2, p. 157–161, 2003.

KOH, D.; NG, V.; NAING, L. Alpha Amylase as a Salivary Biomarker of Acute Stress of Venepuncture from Periodic Medical Examinations. **Frontiers in Public Health**, v. 2, p. 1–5, 2014.

KOOLHAAS, J. M.; KORTE, S. M.; DE BOER, S. F.; VAN DER VEGT, B. J.; VAN REENEN, C. G.; HOPSTER, H.; DE JONG, I. C.; RUIS, M. A.; BLOKHUIS, H. J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 23, n. 7, p. 925–35, 1999a.

KOOLHAAS, J. M.; KORTE, S. M.; DE BOER, S. F.; VAN DER VEGT, B. J.; VAN REENEN, C. G.; HOPSTER, H.; DE JONG, I. C.; RUIS, M. A. W.; BLOKHUIS, H. J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 23, n. 7, p. 925–935, 1999b.

KOOPMANS, S. J.; VAN DER MEULEN, J.; DEKKER, R.; CORBIJN, H.; MROZ, Z. Diurnal rhythms in plasma cortisol, insulin, glucose, lactate and urea in pigs fed identical meals at 12-hourly intervals. **Physiology & Behavior**, v. 84, n. 3, p. 497–503, 2005.

KOYAMA, T.; OMATA, Y.; SAITO, A. Changes in salivary cortisol concentrations during a 24-hour period in dogs. **Hormone and Metabolic Research**, v. 35, n. 6, p. 355–357, 2003.

KOZAKI, T.; HASHIGUCHI, N.; KAJI, Y.; YASUKOUCHI, A.; TOCHIHARA, Y. Effects of saliva collection using cotton swab on cortisol enzyme immunoassay. **European Journal of Applied Physiology**, v. 107, n. 6, p. 743–746, 2009.

KUDIELKA, B.; KIRSCHBAUM, C. Biological basis of the stress response. In: AL'ABSI, M. (Ed.). **Stress and addiction: biological and psychological mechanisms**. Burlington: Academic Press, 2007. p. 3–20.

KVETNANSKY, R.; MCCARTY, R. Adrenal medulla. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 52–60.

LAMBERT, C. **Getting to know poodles: a guide to choosing and owning a poodle**. Kalamunda, Austrália: Animalinfo Publications, 2008.

LOVALLO, W. R.; SOLLERS III, J. J. Autonomic Nervous System. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 282–289.

LUCOT, J. B.; JACKSON, N.; BERNATOVA, I.; MORRIS, M. Measurement of plasma catecholamines in small samples from mice. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 52, n. 2, p. 274–7, 2005.

LUNDBERG, U. Catecholamines. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 419–424.

LUTZ, C. K.; TIEFENBACHER, S.; JORGENSEN, M. J.; MEYER, J. S.; NOVAK, M. A. Techniques for collecting saliva from awake, unrestrained, adult monkeys for cortisol assay. **American Journal of Primatology**, v. 52, n. 2, p. 93–99, 2000.

MALAMUD, D. Saliva as a diagnostic fluid. **Dental clinics of North America**, v. 55, n. 1, p. 159–78, 2011.

MALATHI, N.; MYTHILI, S.; VASANTHI, H. R. Salivary diagnostics: a brief review. **ISRN dentistry**, v. 2014, p. 158786, 2014.

MARIA, A. C. B. E. **Principais alterações encontradas em necropsias de cães e gatos que vieram a óbito durante procedimentos em petshops e similares**. 2010. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

MARIA, A. C. B. E.; REGO, A. A. M. D. S.; MAIORKA, P. C. Necropsy findings in dogs that died during grooming or other pet service procedures. **Journal of Forensic Sciences**, v. 58, n. 5, p. 1189–1192, 2013.

MCCARTY, R.; PACAK, K. Alarm phase and general adaptation syndrome. In: **Encyclopedia of stress**. Fink, G ed. San Diego: Academic Press, 2007. p. 119–123.

MCEWEN, B. S. Stress, definitions and concepts of. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 653–654.

MEDEIROS, V. S. **Indicadores da resposta ao estresse agudo associados com a familiaridade ao ambiente e aos procedimentos de banho e tosa em cães da raça poodle**. 2007. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007.

MEIJER, O. C.; KLOET, E. R.; MCEWEN, B. S. Corticosteroid receptors. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 594–605.

MENARGUES, A.; URIOS, V.; LIMIÑANA, R.; MAURI, M. Circadian rhythm of salivary cortisol in Asian elephants (*Elephas maximus*): a factor to consider during welfare assessment. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 15, n. 4, p. 383–90, 2012.

MILLSPAUGH, J. J.; WASHBURN, B. E.; MILANICK, M. a; BERINGER, J.; HANSEN, L. P.; MEYER, T. M. Non-invasive techniques for stress assessment in white-tailed deer. **Wildlife Society Bulletin**, v. 30, n. 3, p. 899–907, 2002.

MIYAKAWA, M.; MATSUI, T.; KISHIKAWA, H.; MURAYAMA, R.; UCHIYAMA, I.; ITOH, T.; YOSHIDA, T. Salivary Chromogranin A as a Measure of Stress Response to Noise. **Noise and Health**, v. 8, n. 32, p. 108, 2006.

MOBERG, G. P.; MENCH, J. A. **The biology of animal stress**: basic principles and implications for animal welfare. Oxon: CAB International, 2001.

MOCHARLA, H.; MOCHARLA, R.; HODES, M. E. Alpha-amylase gene transcription in tissues of normal dog. **Nucleic acids research**, v. 18, n. 4, p. 1031–1036, 1990.

MUNCK, A. Corticosteroids and Stress. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 613–620.

MURASE, T.; INABA, M.; MAEDE, Y. Measurement of serum glucocorticoids by high-performance liquid chromatography and circadian rhythm patterns of the cortisol value in normal dogs. **The Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 50, n. 5, p. 1133–1135, 1988.

NAKANE, H.; ASAMI, O.; YAMADA, Y.; HARADA, T.; MATSUI, N.; KANNO, T.; YANAIHARA, N. Salivary chromogranin A as an index of psychosomatic stress response. **Biomedical Research, Japan**, v. 19, n. 6, p. 401–406, 1998.

NAKANE, H.; ASAMI, O.; YAMADA, Y.; OHIRA, H. Effect of negative air ions on computer operation, anxiety and salivary chromogranin A-like immunoreactivity. **International Journal of Psychophysiology**, v. 46, n. 1, p. 85–89, 2002.

NETO, J. C. L.; BARBOSA, J. C.; LUNARDI, L. O.; SILVA, A. A. M. R. e; GENARO, G. Effects of surgical stress on the secretion of luteinizing hormone, testosterone and cortisol in the domestic cat (*Felis catus*). **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n. 4, p. 211–214, 2006.

NOTARI, L.; GOODWIN, D. A survey of behavioural characteristics of pure-bred dogs in Italy. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 103, n. 1-2, p. 118–130, 2007.

OTT, S.; SOLER, L.; MOONS, C. P. H.; KASHIHA, M. A.; BAHR, C.; VANDERMEULEN, J.; JANSSENS, S.; GUTIÉRREZ, A. M.; ESCRIBANO, D.; CERÓN, J. J.; BERCKMANS, D.; TUYTTENS, F. a M.; NIEWOLD, T. a. Different stressors elicit different responses in the salivary biomarkers cortisol, haptoglobin,

and chromogranin A in pigs. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 1, p. 124–128, 2014.

OTTENWELLER, J. E. Animal Models (Nonprimate) for Human Stress. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 190–195.

ØVERLI, Ø.; KORZAN, W. J.; HÖGLUND, E.; WINBERG, S.; BOLLIG, H.; WATT, M.; FORSTER, G. L.; BARTON, B. A.; ØVERLI, E.; RENNER, K. J.; SUMMERS, C. H. Stress coping style predicts aggression and social dominance in rainbow trout. **Hormones and behavior**, v. 45, n. 4, p. 235–41, 2004.

OYAMA, D.; HYODO, M.; DOI, H.; KURACHI, T.; TAKATA, M.; KOYAMA, S.; SATOH, T.; WATANABE, G. Saliva collection by using filter paper for measuring cortisol levels in dogs. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 46, p. 20–5, 2014.

PALAZZOLO, D. L.; QUADRI, S. K. The effects of aging on the circadian rhythm of serum cortisol in the dog. **Experimental Gerontology**, v. 22, n. 6, p. 379–87, 1987.

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. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1040, p. 162–71, 2005.

PARANÁ. (Estado). Lei nº 17949 de 10 de janeiro de 2014. Dispõe sobre os serviços comerciais de banho e tosa em animais domésticos de pequeno e grande porte no Estado do Paraná. **Diário Oficial do Estado**, Paraná, 10 jan. 2014

PARATI, G.; CASTIGLIONI, P.; DI RIENZO, M.; MANCIA, G. Arterial Baroreflex. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 248–258.

PARMER, R. J.; XI, X. P.; WU, H. J.; HELMAN, L. J.; PETZ, L. N. Secretory protein traffic. Chromogranin A contains a dominant targeting signal for the regulated pathway. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 2, p. 1042–54, 1993.

PARROTT, R. F.; MISSON, B. H.; BALDWIN, B. A. Salivary cortisol in pigs following adrenocorticotrophic hormone stimulation: comparison with plasma levels. **The British Veterinary Journal**, v. 145, n. 4, p. 362–6, 1989.

PEASTON, R. T.; WEINKOVE, C. Measurement of catecholamines and their metabolites. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 17–38, 2004.

PEDERNERA-ROMANO, C.; VALDEZ, R. A.; SINGH, S.; CHIAPPA, X.; ROMANO, M. C.; GALINDO, F. Salivary cortisol in captive dolphins (*Tursiops truncatus*): a non-invasive technique. **Animal Welfare**, v. 15, n. 4, p. 359–362, 2006.

PEREGO, R.; PROVERBIO, D.; SPADA, E. Increases in heart rate and serum cortisol concentrations in healthy dogs are positively correlated with an indoor waiting-room environment. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, n. 1, p. 67–71, 2014.

PODBERSCEK, A. L.; SERPELL, J. A. Environmental influences on the expression of aggressive behaviour in English Cocker Spaniels. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 52, n. 3-4, p. 215–227, 1997.

POLLARD, T. M. Adrenaline. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 60–64.

QUABBE, H. J.; GREGOR, M.; BUMKE-VOGT, C.; HÄRDEL, C. Pattern of plasma cortisol during the 24-hour sleep/wake cycle in the rhesus monkey. **Endocrinology**, v. 110, n. 5, p. 1641–6, 1982.

RAMOS, A. C. F.; EPPINGHAUS, J. V.; MARQUES, G. Ocorrência de agressividade por cães em estabelecimentos de banho e tosa na cidade de Niterói-RJ. **Nosso Clínico**, v. 49, p. 60–64, 2006.

RINDI, G.; BUFFA, R.; SESSA, F.; TORTORA, O.; SOLCIA, E. Chromogranin A, B and C immunoreactivities of mammalian endocrine cells - Distribution, distinction from costored hormones/prohormones and relationship with the argyrophil component of secretory granules. **Histochemistry**, v. 85, n. 1, p. 19–28, 1986.

RIO DE JANEIRO. (Cidade). Lei nº 5.811 de 4 de dezembro 2014. Disciplina o transporte, manutenção e manejo de animais em pet shops que possuem banho e tosa no Município do Rio de Janeiro e dá outras providências. **Diário Oficial do Município**, Rio de Janeiro, 5 dez. 2014. p. 3.

RUIS, M. A.; TE BRAKE, J. H.; ENGEL, B.; EKKEL, E. D.; BUIST, W. G.; BLOKHUIS, H. J.; KOOLHAAS, J. M. The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender, and stress. **Physiology & Behavior**, v. 62, n. 3, p. 623–30, 1997.

SALIMETRICS. **Saliva collection and handling advice**. 3. ed. 2013. Disponível em: <https://www.salimetrics.com/assets/documents/Saliva_Collection_Handbook.pdf>. Acesso em: 6 fev. 2015.

SÃO PAULO. (Estado). Decreto n.º 40.400 de 24 de outubro de 1995. Aprova Norma Técnica Especial relativa à instalação de estabelecimentos veterinários. **Diário Oficial do Estado**, São Paulo, 25 out. 1995. Sec. 1, p. 1.

SARUTA, J.; TSUKINOKI, K.; SASAGURI, K.; ISHII, H.; YASUDA, M.; OSAMURA, Y. R.; WATANABE, Y.; SATO, S. Expression and Localization of Chromogranin A Gene and Protein in Human Submandibular Gland. **Cells, Tissues, Organs**, v. 180, n. 4, p. 237–44, 2005.

SATO, F.; KANNO, T.; NAGASAWA, S.; YANAIHARA, N.; ISHIDA, N.; HASEGAWA, T.; IWANAGA, T. Immunohistochemical Localization of Chromogranin a in the Acinar Cells of Equine Salivary Glands Contrasts with Rodent Glands. **Cells, Tissues, Organs**, v. 172, n. 1, p. 29–36, 2002.

SCHWAB, K. O.; HEUBEL, G.; BARTELS, H. Free epinephrine, norepinephrine and dopamine in saliva and plasma of healthy adults. **European Journal of Clinical**

Chemistry and Clinical Biochemistry: Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies, v. 30, n. 9, p. 541–4, 1992.

SELYE, H. A Syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 32, 1936.

SELYE, H. **Stress of life**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1956.

SERPELL, J. A. **C-BARQ©**. 2015. Disponível em: <http://vetapps.vet.upenn.edu/cbarq/>. Acesso em: 6 mar. 2015.

SGOIFO, A.; DE BOER, S. F.; WESTENBROEK, C.; MAES, F. W.; BELDHUIS, H.; SUZUKI, T.; KOOLHAAS, J. M. Incidence of arrhythmias and heart rate variability in wild-type rats exposed to social stress. **The American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 273, n. 4, p. H1754–1760, 1997.

SHIRTCLIFF, E. A.; GRANGER, D. A.; SCHWARTZ, E.; CURRAN, M. J. Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: Cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. **Psychoneuroendocrinology**, v. 26, n. 2, p. 165–173, 2001.

SHORT, A. R.; PRATT, C. L. G.; VASS, C. C. N. **A synopsis of physiology**. [s.l.] : Elsevier, 2013.

SJAASTAD, O. V.; SAND, O.; HOVE, K. The Digestive System. In: SJAASTAD, O. V.; SAND, O.; HOVE, K. (Ed.). **Physiology of domestic animals**. 2. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press, 2010. p. 548–551.

SOMOGYI, P.; HODGSON, A. J.; DEPOTTER, R. W.; FISCHER-COLBRIE, R.; SCHOBER, M.; WINKLER, H.; CHUBB, I. W. Chromogranin immunoreactivity in the central nervous system. Immunochemical characterisation, distribution and relationship to catecholamine and enkephalin pathways. **Brain Research Reviews**, v. 8, n. 2-3, p. 193–230, 1984.

STABENFELDT, G. H.; GRECO, D. S. Endocrinologia. In: KLEIN, B. G.; CUNNIGHAM, J. G. (Ed.). **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 413–465.

STANFORD, T. L. Behavior of dogs entering a veterinary clinic. **Applied Animal Ethology**, v. 7, n. 3, p. 271–279, 1981.

STEPHENSON, R. B. Fisiologia cardiovascular. In: KLEIN, B. G.; CUNNIGHAM, J. G. (Ed.). **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 179–300.

STEPTOE, A. Stress effects, overview. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 599–601.

STRIDSBERG, M.; PETTERSSON, A.; HAGMAN, R.; WESTIN, C.; HÖGLUND, O. Chromogranins can be measured in samples from cats and dogs. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 336, 2014.

TAKATSUJI, K.; SUGIMOTO, Y.; ISHIZAKI, S.; OZAKI, Y.; MATSUYAMA, E.; YAMAGUCHI, Y. The effects of examination stress on salivary cortisol, immunoglobulin A, and chromogranin A in nursing students. **Biomedical Research, Japan**, v. 29, n. 4, p. 221–4, 2008.

TEIXEIRA, P. P.; PADUA, J. T. Avaliação dos níveis de cortisol, tiroxina, triiodotironina e glicose como indicativos de estresse em cavalos puro sangue inglês de corrida, antes e após a competição. **Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 39–48, 2006.

THUN, R.; EGGENBERGER, E.; ZEROBIN, K. 24-Hour profiles of plasma cortisol and testosterone in the male Dog: absence of circadian rhythmicity, seasonal influence and hormonal interrelationships. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 25, n. 2, p. 68–77, maio 1990.

THUN, R.; EGGENBERGER, E.; ZEROBIN, K.; LÜSCHER, T.; VETTER, W. Twenty-Four-Hour Secretory Pattern of Cortisol in the Bull: Evidence of Episodic Secretion and Circadian Rhythm. **Endocrinology**, v. 109, n. 6, p. 2208–2212, 1981.

TRIGGS, L. **Establishing endocrine and behavioral parameters of reproduction in pacific walrus**. School of Aquatic and Fishery Sciences: University of Washington, Washington, 2013.

VALENT, P. Disaster syndrome. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 811–814.

VINCENT, I. C.; MICHELL, A. R. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 53, n. 3, p. 342–345, 1992.

WARFORD, T.; MADGWICK, T. Digestive system. In: ORCHARD, G.; NATION, B. (Ed.). **Cell structure & function**. Oxford: Oxford University Press, 2014. p. 226–227.

WATTS, A. G. Anatomy of the HPA Axis. In: FINK, G. (Ed.). **Encyclopedia of stress**. San Diego: Academic Press, 2007. p. 166–171.

WIEMERS, U. S.; SCHULTHEISS, O. C.; WOLF, O. T. Public speaking in front of an unreceptive audience increases implicit power motivation and its endocrine arousal signature. **Hormones and Behavior**, v. 71, p. 69–74, 2015.

WRIGHT, J. C.; NESSELROTE, M. S. Classification of behavior problems in dogs: Distributions of age, breed, sex and reproductive status. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 19, n. 1-2, p. 169–178, 1987.

XAVIER, F. G. **São Paulo Intoxicação por aldicarb (“chumbinho”): I . Estudo das alterações post mortem microscópicas em cães e gatos - II . Avaliação dos efeitos tóxicos agudos em camundongos São Paulo**. 2008. 201 p. Tese (Doutorado).

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

YOKOYAMA, J. S.; ERDMAN, C. a.; HAMILTON, S. P. Array-based whole-genome survey of dog saliva DNA yields high quality SNP data. **PLoS ONE**, v. 5, n. 5, p. 7, 2010.

ZEUGSWETTER, F. K.; NEFFE, F.; SCHWENDENWEIN, I.; TICHY, A.; MÖSTL, E. Configuration of antibodies for assay of urinary cortisol in dogs influences analytic specificity. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 45, n. 2, p. 98–104, 2013.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Departamento de Patologia

Pesquisador: Anna Carolina Barbosa Esteves Maria

Orientador: Paulo César Maiorka

Título do Projeto: ESTRESSE EM CÃES: AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO SALIVAR E SEU PAPEL EM CASOS DE MORTE SÚBITA

Telefone para contato: (11) 3091-1295/ (11) 98375-5433

Email: annacarol.vet@gmail.com

PREZADO PROPRIETÁRIO,

Muitos animais que se submetem aos procedimentos de banho e tosa podem apresentar alterações em suas frequências cardíaca e respiratória, como também alterações comportamentais, tais como agressividade, medo e ansiedade.

Frente a este quadro, este trabalho se propõe a analisar em cães, as alterações nos níveis salivares de cortisol e cromogranina A, assim como avaliar as alterações nos parâmetros fisiológicos e comportamentais desses cães.

As alterações nos parâmetros cardiorrespiratórios serão analisadas através da auscultação cardíaca e respiratória, assim como a mensuração da temperatura que será feita através de um termômetro. Um questionário será entregue para a obtenção de informações em relação à saúde do animal e o comportamento do mesmo em casa e com pessoas desconhecidas.

Para a coleta da saliva, serão utilizados swabs de algodão específicos para coleta de saliva. O swab será introduzido na boca do animal durante dois minutos, podendo o animal mastigar. Não há problema se o swab for engolido pelo animal, o mesmo será eliminado com as fezes alguns dias depois.

O procedimento de coleta de saliva é indolor e, portanto, não será necessário o uso de anestesia.

Não há despesas financeiras para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Durante e após a realização do trabalho, o nome do proprietário ou do animal não será divulgado, garantindo o anonimato.

A participação neste projeto é voluntária e é garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo ao participante.

Em caso de dúvidas sobre esta pesquisa, você poderá entrar em contato com o profissional responsável através do email ou telefones mencionados anteriormente.

Sem mais para o momento, agradeço sua atenção e participação.

Anna Carolina Barbosa Esteves Maria
Médica Veterinária
CRMV-SP 21.306

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PROPRIETÁRIO OU RESPONSÁVEL

NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :

SEXO : ☐ M ☐ F

DATA NASCIMENTO: ____/____/____

BAIRRO: _____

CEP: _____ TELEFONE: (____) _____

EMAIL: _____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL

NOME DO ANIMAL: _____

ESPÉCIE: _____ RAÇA: _____

PELAGEM: _____ SEXO: M ☐ F ☐

DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____

Eu, _____,
proprietário do animal _____, concordo voluntariamente em deixar meu cão, acima citado, participar do projeto “ESTRESSE EM CÃES: AVALIAÇÃO DE MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO SALIVAR E SEU PAPEL EM CASOS DE MORTE SÚBITA”. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Anna Carolina Barbosa Esteves Maria sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos decorrentes da participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do proprietário: _____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste proprietário para a participação de seu(s) animal(is) neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo: _____

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO ESPECÍFICO

1- Com quanto tempo de vida o animal começou a frequentar o pet shop para procedimentos como banho e tosa?

2- Com qual frequência o animal é levado ao pet shop para procedimentos como banho e tosa?

- a) Uma vez por semana.
- b) A cada quinze dias.
- c) Uma vez por mês.
- d) O intervalo entre procedimentos excede um mês.

3- Há quanto tempo o animal frequenta o estabelecimento em questão?

4- No pet shop, o animal geralmente é manipulado por um funcionário do sexo:

- a) feminino.
- b) masculino.

5- Como o animal chega ao pet shop?

- a) Caminhando.
- b) Transportado pelo carro do proprietário.
- c) Transportado pelo "Táxi Dog".

6- O animal já agrediu algum funcionário de pet shop durante o banho ou tosa? Se sim, quantas vezes?

7- O animal, alguma vez, voltou do pet shop com marcas no corpo? Onde se localizavam e como eram as lesões?

8- Depois de voltar do pet shop, o animal apresenta:

- a) comportamento normal.
- b) sinais de cansaço.
- c) inquietação.

APÊNDICE C - FICHA DE AVALIAÇÃO

Nome do animal: _____ Nº _____

Nome do proprietário: _____

Data: _____

PONTO 1: CHEGADA DO ANIMAL AO PET SHOP

Horário: _____

O animal:

- a) precisa ser arrastado para dentro do recinto;
- b) caminha hesitantemente ou esconde-se atrás do condutor;
- c) caminha sem puxar a coleira;
- d) caminha puxando a coleira.

Comportamentos:

- a) "Comportamento aversivo": Sim () Não ()
- b) Tremores: Sim () Não ()
- c) Postura:
- d) Posição das orelhas:
- e) Posição do rabo:
- f) Vocalização:
- g) Salivação: Normal () Excessiva ()

Observações:

PONTO 2: EXAME FÍSICO PRÉ-BANHO

Horário: _____

Frequência cardíaca:

Frequência respiratória:

T.P.C.:

Coloração de mucosas:

Temperatura:

Comportamentos:

- a) "Comportamento aversivo": Sim () Não ()
- b) Tremores: Sim () Não ()
- c) Postura:
- d) Posição das orelhas:
- e) Posição do rabo:
- f) Vocalização:
- g) Salivação: Normal () Excessiva ()

PONTO 3: ENTRADA NO RECINTO DE BANHO E TOSA

Horário: _____

O animal:

- a) precisa ser arrastado para dentro do recinto;
- b) caminha hesitantemente ou esconde-se atrás do condutor;
- c) caminha sem puxar a coleira;
- d) caminha puxando a coleira.

Comportamentos:

- a) “Comportamento aversivo”: Sim () Não ()
- b) Tremores: Sim () Não ()
- c) Postura:
- d) Posição das orelhas:
- e) Posição do rabo:
- f) Vocalização:
- g) Salivação: Normal () Excessiva ()

Observações:

PONTO 4: DURANTE O BANHO

Comportamentos:

- a) “Comportamento aversivo”: Sim () Não ()
- b) Tremores: Sim () Não ()
- c) Postura:
- d) Posição das orelhas:
- e) Posição do rabo:
- f) Vocalização:
- g) Salivação: Normal () Excessiva ()

Observações:

PONTO 5: APÓS O BANHO

Horário: _____

Comportamentos:

- a) “Comportamento aversivo”: Sim () Não ()
- b) Tremores: Sim () Não ()
- c) Postura:

- d) Posição das orelhas:
- e) Posição do rabo:
- f) Vocalização:
- g) Salivação: Normal () Excessiva ()

PONTO 6: PARA PROCEDIMENTOS DE TOSA

Horário: _____

Comportamentos *durante* a tosa:

- a) “Comportamento aversivo”: Sim () Não ()
- b) Tremores: Sim () Não ()
- c) Postura:
- d) Posição das orelhas:
- e) Posição do rabo:
- f) Vocalização:
- g) Salivação: Normal () Excessiva ()

Observações:

Análise *depois* da tosa:

Frequência cardíaca:

Frequência respiratória:

Coloração de mucosas:

Temperatura:

ANEXO A – QUESTIONÁRIO C-BARQ©

1. Nome do cão:

2. Idade do cão:

3. Raça (se for mista, escreva “sem raça definida” (SRD)):

4. Sexo:

a) Feminino

b) Masculino

5. Peso aproximado (kg):

6. Onde adquiriu o cão:

a) Do seu próprio canil;

b) De um canil;

c) De um abrigo;

d) De um vizinho, amigo ou parente;

e) Comprou em um pet shop;

f) Pegou da rua;

g) Outra opção.

7. Quantos anos o cão tinha quando você o adquiriu? Observação: se você indicou que tem seu próprio canil na pergunta anterior, coloque “0” (zero). Se você não tem certeza da idade que o seu cão tinha quando você o adquiriu, por favor, deixe este campo em branco.

8. O cão foi esterilizado ou castrado?

9. Caso tenha respondido sim, com que idade o cão foi castrado? Observação: Se você não tiver certeza de quando o cão foi castrado, por favor, deixe o campo em branco.

10. Qual foi o principal motivo para castrar este cão?

a) Controle populacional;

b) Exigência do criador, abrigo ou ONG;

c) Para corrigir ou diminuir um problema comportamental já existente;

d) Para corrigir ou diminuir um problema de saúde já existente;

e) Para prevenir futuros problemas de comportamento;

f) Para prevenir futuros problemas de saúde;

g) Recomendação do veterinário;

h) Nenhuma das alternativas/não sei dizer.

11. Este cão tem algum problema significativo de saúde?

12. Caso esteja, por favor, descreva o problema brevemente (10 palavras ou menos):

13. Atualmente, você está tendo problemas com o comportamento ou temperamento do cão?

a) Nenhum problema;

- b)** Apenas problemas pequenos;
- c)** Problemas moderados;
- d)** Problemas sérios.

- f)** mais novo(s) e da mesma idade;
- g)** mais velho(s), mais novo(s) e da mesma idade

14. O cão está ou esteve envolvido em alguma destas atividades ou funções?

- a)** Reprodução/Exposição;
- b)** Provas a campo/Caçada;
- c)** Outros esportes (ex.: Agility);
- d)** Trabalhos (cão farejador, cão de guarda, cão de pastoreio etc.);
- e)** Nenhuma das alternativas acima.

15. Este é o primeiro cão que você já teve?

16. Se não, quantos cães você já teve?

17. Você cresceu tendo cães quando era criança/adolescente (0-16 anos)?

18. Há outros cães na sua casa?

19. Se sim, estes cães são:

- a)** mais velhos;
- b)** mais novos;
- c)** da mesma idade;
- d)** mais velho(s) e mais novo(s);
- e)** mais velho(s) e da mesma idade;

Seção 1: Treinamento e obediência

Alguns cães são mais obedientes e respondem melhor a treinamento que outros. Por favor, indique o quão bem seu cão responde a treinamento ou quão obediente o cão tem sido nas seguintes situações no passado recente.

1. Quando não está usando uma coleira, volta imediatamente quando chamado.
2. Obedece ao comando "senta" imediatamente.
3. Obedece ao comando "fica" imediatamente.
4. Parece prestar atenção/ouvir tudo o que você diz e faz.
5. Demora a responder à correção ou à punição.
6. Demora a aprender novos truques ou tarefas.
7. Distrai-se facilmente com estímulos visuais, sons ou odores.
8. Busca ou tenta buscar gravetos, bolas ou objetos.

Seção 2: Agressão

Alguns cães apresentam comportamento agressivo de tempos em tempos. Sinais típicos de agressividade moderada em cães são latidos, rosnados e a mostra de dentes. Atitudes agressivas geralmente incluem dentadas, mordeduras ou tentativas de mordedura. Ao assinalar as escalas seguintes, por favor, indique as tendências recentes do seu cão a comportamentos agressivos em cada um dos contextos abaixo:

9. Quando sofre correção ou punição verbal (broncas, gritos etc.) por você ou um membro da família.	☐	☐	☐	☐	☐
10. Quando um adulto estranho se aproxima diretamente do cão enquanto está na coleira passeando/fazendo exercício.	☐	☐	☐	☐	☐
11. Quando uma criança estranha se aproxima enquanto o cão está na coleira passeando/fazendo exercícios.	☐	☐	☐	☐	☐
12. Com pessoas estranhas se aproximando do cão enquanto ele está no seu carro (num posto de gasolina, por exemplo).	☐	☐	☐	☐	☐
13. Quando brinquedos, ossos e outros objetos são tirados dele por um membro da casa.	☐	☐	☐	☐	☐
14. Quando um membro da casa está dando banho ou escovando-o.	☐	☐	☐	☐	☐
15. Quando uma pessoa estranha se aproxima de outro membro da sua família em casa.	☐	☐	☐	☐	☐
16. Quando pessoas estranhas se aproximam de você ou de outra pessoa da família fora de casa.	☐	☐	☐	☐	☐

.....
Seção 3: Medo e ansiedade

Cães, algumas vezes, demonstram ansiedade ou medo quando expostos a certos sons, objetos, pessoas ou situações. Sinais típicos de medo leve a moderado incluem: evitar contato visual, evitar o objeto que inspira medo, agachar-se ou encolher-se com o rabo abaixado ou entre as pernas, choramingar, ficar paralisado, tremer. Medo extremo é caracterizado por encolhimento exagerado, e/ou tentativas de fugir, recuar ou esconder-se de algum objeto, pessoa ou situação de que o cão tenha medo. Ao assinalar as escalas abaixo, por favor, indique a tendência recente do seu cão para demonstrar comportamentos de medo e ansiedade nos seguintes contextos:

36. Quando um adulto estranho se aproxima dele enquanto ele está longe da sua casa.	☐	☐	☐	☐	☐
37. Quando uma criança estranha se aproxima dele enquanto ele está longe da sua casa.	☐	☐	☐	☐	☐
38. Em resposta a barulhos repentinos ou altos (ex. aspirador de pó, escapamentos de carros, britadeiras, objetos que caem etc.).	☐	☐	☐	☐	☐
39. Quando pessoas estranhas visitam a sua casa.	☐	☐	☐	☐	☐
40. Quando uma pessoa estranha tenta tocar ou fazer carinho no cão.	☐	☐	☐	☐	☐
41. No trânsito.	☐	☐	☐	☐	☐

	AUSÊNCIA DE MEDO/ANSIEDADE	LEVE A MODERADO MEDO/ANSIEDADE	MEDO EXTREMO	NÃO OBSERVÁVEL/NÃO APLICÁVEL
	Sem sinais visíveis de medo		Agacha-se, recua, esconde-se etc.	
42. Em resposta a objetos estranhos na calçada ou perto dela (ex. sacolas plásticas, folhas, lixo, bandeiras etc.).	☐	☐	☐	☐
43. Quando examinado/tratado por um médico veterinário.	☐	☐	☐	☐
44. Durante tempestades com trovões; fogos de artifício ou eventos parecidos.	☐	☐	☐	☐
45. Quando um cão estranho do mesmo porte ou maior se aproxima.	☐	☐	☐	☐
46. Quando um cão estranho de porte menor se aproxima.	☐	☐	☐	☐
47. Quando exposto a uma situação não familiar pela primeira vez(ex. primeira viagem de carro, primeira vez num elevador, primeira visita ao veterinário etc.).	☐	☐	☐	☐
48. Em resposta a ventos ou objetos lançados pelo vento.	☐	☐	☐	☐
49. Quando tem as unhas cortadas por um membro da casa.	☐	☐	☐	☐
50. Quando um membro da casa dá banho ou escova o cão.	☐	☐	☐	☐

51. Quando o cão tem os pés enxugados por um membro da casa.

☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐

52. Quando cães não familiares visitam a sua casa.

☐	☐	☐	☐	☐
-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

53. Quando um cão estranho late, rosna ou avança nele.

☐	☐	☐	☐	☐
-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

.....

54. Tem tremedeiras.

☐	☐	☐	☐	☐
-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

55. Saliva excessivamente.

☐	☐	☐	☐	☐
-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

56. Apresenta inquietação ou agitação.

☐	☐	☐	☐	☐
-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

57. Choraminga.

☐	☐	☐	☐	☐
-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------	-----------------------

Seção 5: Excitabilidade

Alguns cães esboçam relativamente pouca reação a eventos súbitos ou potencialmente excitantes e agitação no seu ambiente, enquanto outros ficam extremamente excitados com qualquer novidade. Sinais de excitabilidade leve a moderada incluem: alerta, movimento em direção à fonte da novidade, e breves momentos de latidos. Excitabilidade extrema é caracterizada por uma tendência geral ao exagero. O cão excitado late e grane histericamente à menor perturbação e é difícil de acalmar. Ao assinalar as escalas a seguir, por favor, indique as tendências recentes do seu cão à excitabilidade em cada um dos contextos abaixo:

62. Quando você ou outros membros da casa chegam em casa depois de uma ausência breve.
63. Quando brinca com você e outros membros da casa.
64. Quando a campainha toca.
65. Instantes antes de sair para passear.
66. Instantes antes de sair de carro.
67. Quando visitas chegam à sua casa.

Seção 6: Apego e busca por atenção

A maioria dos cães tem apego aos seus proprietários e alguns demandam bastante atenção e carinho. Pensando no passado recente, com que frequência seu cão tem demonstrado estes sinais:

68. Demonstra forte apego a um membro específico da casa.

69. Tende a seguir você (ou outro membro da casa) pela casa, de quarto em quarto.

70. Tende a sentar perto ou em contato com você (ou outros) quando você está sentado.

71. Tende a pedir atenção (utilizando, por exemplo, o nariz ou a mão) a você ou a qualquer outra pessoa que esteja sentada.

72. Fica agitado (choraminga, pula, tenta intervir) quando você (ou outros) demonstra(m) afeto a outra pessoa.

73. Fica agitado (chora, pula, tenta intervir) quando você (ou outros) demonstra(m) afeto outro cão ou animal.

☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐
☐	☐	☐	☐	☐	☐