**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE PSICOLOGIA**

ANGÉLICA DA SILVA VASCONCELLOS

**O estímulo ao forrageamento como fator de
enriquecimento ambiental para lobos guarás: efeitos
comportamentais e hormonais**

**São Paulo
2009**

ANGÉLICA DA SILVA VASCONCELLOS

**O estímulo ao forrageamento como fator de
enriquecimento ambiental para lobos guarás: efeitos
comportamentais e hormonais**

Tese apresentada ao Instituto de
Psicologia da Universidade de São
Paulo como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Doutor
em Psicologia.

Área de Concentração: Psicologia
Experimental

Orientador: Prof. Dr. César Ades

São Paulo

2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Biblioteca Dante Moreira Leite
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Vasconcellos, Angélica da Silva.

O estímulo ao forrageamento como fator de enriquecimento ambiental para lobos guarás: efeitos comportamentais e hormonais / Angélica da Silva Vasconcellos; orientador César Ades. -- São Paulo, 2009.

137 p.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Psicologia Experimental) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Lobo guará 2. Bem-estar animal 3. Enriquecimento ambiental 4. Stress 5. Comportamento de forrageamento animal I. Título.

QL737.C22

Nome: Vasconcellos, Angélica da Silva

Título: O estímulo ao forrageamento como fator de enriquecimento ambiental para lobos guarás: efeitos comportamentais e hormonais

Tese apresentada ao Instituto de Psicologia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Psicologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Esta tese é dedicada aos animais não-humanos, criaturas que muitas vezes sofrem injúrias em função das atitudes impensadas dos seres humanos, e tem por objetivo dar voz a esses seres, para que, ouvindo-os, possamos nos tornar mais compassivos e humanos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor César Ades, pela orientação, incentivo e conversas apaixonadas a cada nova descoberta.

Aos professores Vanner Boere Souza e Patrícia Izar pelas produtivas sugestões apresentadas por ocasião do exame de qualificação.

Ao professor Cláudio Alvarenga de Oliveira e equipe pela utilização do Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) - FMVZ/USP.

Ao professor Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães pela ajuda na compreensão dos dados hormonais e sugestões de procedimentos.

À Cristiane Pizzutto, pelo apoio.

À amiga Valerie Hare, pela motivação, apoio, incentivo e exemplo de trabalho em prol do bem-estar de animais cativos.

Aos amigos Andréa e Eugênio, pela ajuda imprescindível na coleta de dados quando houve perda de parte do material já coletado.

À amiga Maria Angélica, pela companhia e incansável disposição para as extrações hormonais.

Às amigas Cristina Ortega e Daniela Ramos, pela revisão do texto.

À Marie, pelas inúmeras dicas na interpretação de dados que desafiavam nossa compreensão.

A todos os colegas de laboratório: Patrícia, Nina, Carine e Maria, não só por trazerem dicas importantes vindas de sua experiência, mas principalmente por partilharem comigo o momento de busca de soluções e compreensão; e a Dilmar, Fábio e Hugo por comentários, contribuições ou simplesmente pelo companheirismo nos momentos críticos.

Às instituições onde se realizou a coleta de dados: Zoológico de São Bernardo do Campo, representado pelo Marcelo, Associação Mata Ciliar, representada pela Cristina e Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, representado pela Cecília, pela disposição de abrirem suas portas para trabalhos de pesquisa, bem como por facilitarem ao máximo os procedimentos necessários.

Aos grandes colaboradores Francisco Ribeiro e Jefferson, pela dedicação com que facilitaram o trabalho nos zoológicos.

À Secretaria do Departamento de Psicologia Experimental do IP / USP pela atenção e presteza.

Ao Expresso ABC, que partilhou das etapas, emoções e preocupações associadas a este trabalho, sempre trazendo sugestões, muitas das quais mostraram-se valiosíssimas.

A minha família: Maria Aparecida, Dourival, Márcia, Luís e Felipe pelo apoio.

Aos lobos guarás, por simplesmente existirem, serem belos e irresistíveis.

À FAPESP e USP pelo apoio financeiro e logístico.

E, finalmente, a todos os colegas e amigos pelo apoio e incentivo constantes.

“Só nos importaremos se compreendermos.

Só ajudaremos se nos importarmos.

Só os salvaremos se os ajudarmos.”

Jane Goodall

RESUMO

Vasconcellos, A. S. (2009). *O estímulo ao forrageamento como fator de enriquecimento ambiental para lobos guarás: efeitos comportamentais e hormonais*. Tese de Doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*), uma espécie vulnerável, tem apresentado problemas reprodutivos e de bem-estar em cativeiro. Buscando técnicas eficazes para melhorar os níveis de bem estar destes animais, e dando continuidade a estudo anterior, procurou-se investigar os efeitos da dispersão do alimento e variáveis possivelmente relacionadas à variabilidade individual e de gênero nas respostas comportamentais e hormonais ao enriquecimento. Foram aplicadas, a 11 animais de três instituições, técnicas de enriquecimento ambiental que consistiam na manipulação da variedade, quantidade e complexidade de estímulos alimentares, com registro do comportamento e dosagem de metabólitos fecais de glicocorticóides. Condições de linha de base e experimentais foram intercaladas no delineamento experimental. Foram aplicados testes de Objeto Novo para mensurar diferenças individuais e de gênero possivelmente envolvidas na resposta ao enriquecimento, e Testes de Escolha para avaliar a preferência dos animais pela busca do alimento. O enriquecimento levou, durante a sua aplicação, a um aumento significativo na frequência de comportamentos de forrageamento, sendo mais marcado o efeito nos indivíduos que tiveram concentrações de glicocorticóides diminuídas durante o enriquecimento. Observou-se que o gênero dos animais influenciava as respostas hormonais aos procedimentos e registrou-se correlação entre o perfil comportamental das fêmeas e sua reação hormonal ao enriquecimento (fêmeas com perfil exploratório tiveram aumento na concentração de metabólitos de glicocorticóides; as com perfil cauteloso, uma redução), um resultado não replicado com os machos. Os Testes de Escolha demonstraram preferência dos animais por uma forma de forrageamento que demandava investimento de esforço, em

detrimento da alternativa de acesso *ad lib* ao alimento, dando assim uma indicação do valor desses procedimentos para os lobos guarás cativos. O registro de perfis emocionais e a correlação destes com diferentes respostas hormonais ao enriquecimento são inéditos para a espécie e relevantes para as áreas de bem-estar e conservação. Os dados apontam para a importância de uma avaliação dos perfis emocionais individuais de animais cativos, como forma de se delinearem procedimentos que sejam efetivos para a promoção do bem-estar dos mesmos. Em adição a este achado, a preferência registrada pela busca do alimento, assim como o aumento na frequência de forrageamento produzido pelas técnicas de enriquecimento usadas sugerem ser estas técnicas eficazes para o aumento dos níveis de bem-estar de lobos-guarás em cativeiro.

Palavras-chave: Lobo guará. Bem-estar animal. Enriquecimento ambiental. Estresse. Comportamento de forrageamento animal.

ABSTRACT

Vasconcellos, A. S. (2009). *The stimulus to foraging as an environmental enrichment factor for maned wolves*. Tese de Doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The maned wolf, a vulnerable species, has presented problems related to reproduction and welfare in captivity. This study aimed to find efficient techniques to improve the welfare levels of these animals, as a continuation of previous studies. In order to achieve this objective, we investigated the effects of dispersion of food and possible variables related to individual and gender variability in the behavioural responses to environmental enrichment. We applied environmental enrichment techniques to 11 animals, in three institutions. These techniques consisted of the manipulation of the variety, quantity and complexity of feeding stimulus, with evaluation of behaviour and glucocorticoid metabolites. Baseline and experimental conditions were intercalated in the experimental design. Novel Objects were applied in order to measure individual and gender differences, possibly involved in the responses to the environmental enrichment. Choice Tests were used to evaluate the preference of the animals for searching for food. Enrichment promoted a significant increase in foraging. This increase was stronger in the individuals who had diminished glucocorticoid metabolites concentrations during the enrichment. The gender of the animals had affected the hormonal responses to the procedures. There was also a correlation between the behavioural profiles of females and their hormonal reaction to the enrichment (exploratory females had an increase in the glucocorticoid concentrations, whilst cautious ones had a decrease), a result that was not observed in the males. The Choice Tests indicated a preference for a form of laborious foraging, indicating the great value of these procedures to the captive maned wolves. The emotional profiles and the correlation of these profiles with different hormonal responses to the enrichment are original and relevant to the welfare and conservation areas. Our outcomes point to the importance of an

evaluation of emotional profiles of captive animals to effectively design procedures to improve welfare of captive animals. In addition to that, the observed preference for the searching of food, as well as the increased foraging promoted by the techniques suggest that these procedures are efficient to improve the welfare in captive maned wolves.

Keywords: Maned wolf. Animal welfare. Environmental enrichment. Stress. Foraging.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

O lobo guará	14
Estresse e enriquecimento ambiental	18
Hormônios e bem-estar	23
Perfis de resposta a desafios ambientais	27
O uso do enriquecimento ambiental para promoção de bem-estar em lobos guarás	32
Objetivos	34

MATERIAL E MÉTODO

Locais de estudo e amostra	37
Experimento de enriquecimento ambiental	39
<i>Fase I: Linha de Base</i>	42
<i>Fase II: Enriquecimento</i>	42
<i>Fase III: Linha de Base</i>	44
<i>Fase IV: Enriquecimento</i>	44
Teste de Objeto Novo	44
Teste de Escolha	47
Extração e radio-imuno ensaio	49
<i>Extração hormonal</i>	50
<i>Quantificação hormonal</i>	50
Análises estatísticas	51

RESULTADOS

Teste de Objeto Novo	54
Efeitos comportamentais	55
Efeitos hormonais	58
<i>Interações entre fatores</i>	<i>62</i>
<i>Correlações entre MGC e comportamentos</i>	<i>65</i>
Teste de Escolha	67

DISCUSSÃO

<i>Efeitos globais do enriquecimento</i>	<i>72</i>
<i>Efeitos do temperamento sobre as concentrações de MGC</i>	<i>73</i>
<i>Efeitos do temperamento sobre o comportamento</i>	<i>75</i>
<i>Efeitos do gênero</i>	<i>76</i>
<i>Juntando os achados</i>	<i>80</i>

CONCLUSÕES	82
-------------------------	-----------

APÊNDICES

Apêndice A	85
Apêndice B	93
Apêndice C	94
Apêndice D	96
Apêndice E	97
Apêndice F	100
Apêndice G	104
Apêndice H	108

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112
---	------------

INTRODUÇÃO

O lobo guará

Os lobos guarás (*Chrysocyon brachyurus*) são os maiores canídeos sul-americanos. Apresentam larga distribuição, que inclui regiões ao norte e nordeste da Argentina, oeste da Bolívia (Cabrera, 1957; Nowak & Paradiso, 1985), Peru (Dietz, 1984; Beccaceci, 1991) e Uruguai (Mones & Olazarri, 1990). No Brasil, são encontrados nas regiões Central, Sudeste e Sul (Cabrera, 1957; Dietz, 1984; Nowak & Paradiso, 1991), principalmente em áreas de cerrado (Rodden et al., 2004). Apesar de sua ampla distribuição, lobos guarás estão em vias de se tornarem ameaçados (*International Union for the Conservation of Nature*, 2008), especialmente devido à expansão da agricultura nas áreas de ocorrência da espécie (Fonseca et al., 1994). Considerando esta ameaça crescente, as populações silvestres da espécie tendem a decrescer, fato que torna essencial o estabelecimento de uma população *ex-situ* sustentável e em boas condições de bem-estar.

Os ambientes preferenciais dos lobos guarás são lugares com vegetação aberta, especialmente os próximos a baixadas com capoeirões, áreas de várzeas, matas arbustivas e áreas de cerrado, distantes de habitações humanas (Dietz, 1984). Os indivíduos não formam alcateias; são caçadores solitários e são vistos aos pares somente durante a época de reprodução.

Lobos guarás parecem ser monogâmicos facultativos: enquanto casais partilham de 50 a 90% de seus territórios, animais vizinhos do mesmo gênero apresentam uma sobreposição menor de seus territórios (entre 10 e 20% para fêmeas e 1% para machos, Trolle et al., 2007). A estimativa de tamanho da área ocupada por casais varia grandemente entre os trabalhos, com números que vão de 22 km² (Dietz, 1984) até 115 km² (Carvalho & Vasconcellos, 1995; Silveira, 1999). Essa

variabilidade pode estar relacionada à disponibilidade alimentar em cada sítio (Rodrigues, 2002).

Alimentam-se de frutas, pequenos mamíferos (principalmente roedores) e aves, de acordo com a disponibilidade sazonal (Santos et al., 2003; Queirolo & Motta-Junior, 2007; Rodrigues, 2007). A distribuição do consumo médio de itens alimentares pode apresentar ligeira variação nas proporções entre itens animais e vegetais nas diferentes localidades: de 44,6% (Motta-Junior, 1997 em Jataí, SP) a 59,4% (Rodrigues, 2002 em Águas Emendadas, DF) de procedência vegetal e de 55,4% (Motta-Junior, 1997) a 40,3% (Rodrigues, 2002) de procedência animal. Os itens alimentares de origem animal são, em sua maioria, compostos por animais noturnos, pequenos (pesando menos que 1 kg), terrícolas e habitantes de áreas campestres e/ou de cerrado (Motta-Junior, 1997). A maior parte destes itens é composta por pequenos roedores e aves. O nicho alimentar desses animais é o maior entre as espécies mais comuns de canídeos brasileiros (Jácomo et al., 2004). Embora em várias ocasiões carcaças de animais estivessem disponíveis, Dietz (1984) relata nunca ter observado lobos guarás se alimentando delas. O autor também classifica como incomum a predação de gado adulto, bezerros, ovelhas ou porcos, sendo frequente somente a caça de galinhas ou leitões, ocasiões em que, muitas vezes, são os lobos mortos pelos fazendeiros. Aragona e Setz (2001), que estudaram a dieta dos lobos no Parque Estadual de Ibitipoca, relatam a presença de material antrópico não comestível em grande parte das amostras fecais (de 25 a 40% das amostras).

Lobos guarás são predominantemente noturnos, mas apresentam também atividade diurna (35% das horas durante o dia e 91% das horas noturnas, Dietz, 1984). Caminham por distâncias relativamente longas – até 16 quilômetros por dia (Bandeira de Melo et al., 2007) e a distância das jornadas noturnas pode depender das condições de iluminação – são mais curtas em noites de lua cheia (Sábato et al., 2006). Durante o dia, os lobos descansam em locais com vegetação rasteira, grama ou arbustos, movimentando-se pouco. Antes do pôr-do-sol, os animais deixam as áreas de descanso e passam a mover-se por sua área de vida. Esse deslocamento continua durante a maior parte da noite, com pequenas pausas de até 20 minutos. São mais ativos durante dias chuvosos ou com neblina que em dias ensolarados

(Dietz, 1984).

Segundo Dietz (1984), os lobos são muito sensíveis à presença física do ser humano. Assim que detectam a presença de seres humanos, os lobos buscam guarida atrás de arbustos ou se encolhem junto ao chão, movendo-se somente se a proximidade for menor que dois ou três metros. Nesse caso, tendem a arrepiar-se, a vocalizar e a buscar abrigo próximo. Os limites de territórios são marcados por fezes em locais específicos e elevados, tais como morros e cupinzeiros, e por marcos que representam barreiras físicas (como estradas e rios). Após a morte de um residente, seu território é ocupado por um indivíduo do mesmo sexo (Machado et al., 1998) e, caso ocorram encontros entre animais da mesma espécie, estes utilizam uma estratégia de evitação mútua. Dentro dos territórios, ocorre a marcação com urina (Dietz, 1984); acredita-se que os lobos utilizem um rugido-latido para anunciar sua localização dentro do território, promovendo assim o espaçamento dos indivíduos (Kleiman, 1972).

Lobos guarás são comuns nos zoológicos brasileiros. Embora os recintos em que são normalmente mantidos pareçam ser adequados para a manutenção de indivíduos adultos, esses recintos e as técnicas de manejo atualmente utilizadas têm se mostrado ainda inadequados para garantir o sucesso reprodutivo da espécie (Rodden & Rosenthal, 1995; Maia & Gouveia, 2002). Os nascimentos são relativamente comuns, mas a taxa de mortalidade é alta para filhotes com menos de um ano (71%), influenciada principalmente por incompetência parental, uma provável consequência das restrições impostas pelo cativeiro (Maia & Gouveia, 2002). Sua gestação dura cerca de 63 dias e a fêmea é quem provê a maior parte do cuidado parental (Dietz, 1984).

Embora se trate de espécie em vias de se tornar ameaçada, os trabalhos de campo com lobos guarás não são numerosos. Os trabalhos existentes abordam os temas dieta (Motta-Junior, 1997; Aragona & Setz, 2001; Belentani, 2001; Santos et al., 2003; Childs-Sanford & Angel, 2006; Queirolo & Motta-Junior, 2007; Rodrigues et al., 2007); dispersão de sementes (Lombardi & Motta-Junior, 1993; Santos et al., 2003); ecologia, conservação e padrão de atividade (Dietz, 1984; Silveira, 1999; Rodrigues, 2002; Sábato et al., 2006; Bandeira de Melo et al., 2007; Trolle et al., 2007; Coelho

et al., 2008; Bandeira de Melo et al., 2009; Jácomo et al., 2009; Silveira et al., 2009); determinação da área de vida (Mantovani, 2001; Rodrigues, 2002); genética populacional (Mattos, 2003), endocrinologia (Songsasen et al., 2006; Maia et al., 2008) e efeitos da proximidade com seres humanos (Figueira, 1998). Estudos ainda são necessários, em especial no que concerne ao bem-estar desses animais, necessidade que pode ser amenizada pelos experimentos de cativeiro.

Grande parte dos estudos com lobos guarás é proveniente de observações de comportamento e reprodução em cativeiro (Motta-Junior, 1997). Devido à falta de dados sobre estes animais em vida livre, foi criado em 1984 um plano de manejo para a sobrevivência da espécie (*Maned Wolf Species Survivor Plan – MWSSP*). Desde então, foram realizados vários trabalhos sobre comportamento parental (Rasmussen & Tilson, 1984; Veado, 1994; Bestelmeyer, 2000), comportamento social (Kleiman, 1972; Brady, 1982; Biben, 1983), repertório vocal (Brady, 1981), comportamento e fisiologia reprodutiva (Wasser, 1995; Rodden, 1997; Velloso et al., 1998; Maia & Gouveia, 2002), manejo (Acosta, 1972; Bartmann, 1980; Velloso, 1991), morfologia e fisiologia geral (Barboza et al., 1994; Pessutti, 1997), patologias (Burton & Ramsay, 1986; Costa & Lima, 1988; Cassali et al., 2009; Cracknell et al., 2009; May et al., 2009; Vynne & Kinsella, 2009) e enriquecimento ambiental (Cummings et al., 2007; Vasconcellos et al., 2009).

Os registros de cativeiro apontam para uma baixa frequência de contato físico entre co-específicos. Ocorre demarcação de território em cativeiro através de três tipos de comportamento: os animais podem urinar, defecar ou friccionar partes de seu corpo no local a ser marcado (Garcia, 1983). Em recintos em que se encontra um casal, é comum macho e fêmea caminharem pela área, em espaços diferentes, podendo haver, embora raramente, comportamento agressivo quando se encontram. A agressão, quando ocorre, geralmente se dá na hora da alimentação. Ocasionalmente, os lobos carregam o alimento para consumi-lo em outro lugar, frequentemente depois de terem apresentado comportamento agressivo (Garcia, 1983). Entretanto, não se tem registro de precedência definida do macho ou da fêmea na alimentação (Dietz, 1984); alternam-se os casos em que fêmeas e machos se adiantam para alimentar-se. Isso pode significar não haver uma dominância estabelecida entre os sexos.

Estresse e enriquecimento ambiental

As técnicas de enriquecimento ambiental são utilizadas para reduzir o estresse causado pelo cativeiro, que pode ser expresso através de condições fisiológicas inadequadas, de comportamentos e padrões de atividade atípicos para a espécie e de comportamentos estereotipados.

Segundo definição do BHAG (*Behaviour and Husbandry Advisory Group*), conselho criado no *workshop* da *American Zoo and Aquarium Association*, enriquecimento ambiental é um processo que tem por objetivo a melhora dos ambientes de cativeiro e das técnicas de manejo, da perspectiva da biologia comportamental e da história natural dos animais cativos. Seria um processo dinâmico, no qual mudanças na estrutura dos ambientes e nas práticas de manejo são feitas para aumentar as possibilidades de escolha dos animais, promovendo comportamentos e habilidades apropriados à espécie, aumentando assim os níveis de bem-estar dos animais cativos (Young, 2003).

Embora desde 1911 já tenhamos registros de iniciativas para melhorar a qualidade de vida de animais cativos, tais como a sugestão apresentada à Sociedade Zoológica do Reino Unido para a colocação de brinquedos para ursos polares (Young, 2003), a significância do enriquecimento foi reconhecida primeiramente por Yerkes em 1925 e, posteriormente, por Hediger (1950, 1969), que identificou a importância do ambiente físico e social dos animais cativos, bem como o impacto dos regimes de manejo e dieta no bem-estar desses animais.

Investigações iniciadas há mais de meio século consolidaram a ideia de que um ambiente com estimulação física apropriada e socialmente compatível poderia ter profundos efeitos na resposta emocional dos indivíduos, no poder de resolução de problemas, na diminuição de efeitos deletérios e na capacidade de recuperação rápida diante de eventos desafiadores (Rosenzweig & Bennet, 1996). Em 1957, Ferster e Skinner conduziram seus estudos em condicionamento operante e programas de reforço e, entre seus achados, estavam as respostas observadas em animais alocados em pequenas caixas, sem enriquecimento e reforçados com periodicidade fixa, ou seja, que recebiam alimento independentemente de seu procedimento. Esses animais passaram a prever a duração do intervalo entre os

reforços e a antecipar a chegada do alimento, desenvolvendo comportamentos estereotipados, resultado que, décadas depois, chamaria a atenção de Carlstead (1998) pela similaridade com comportamentos apresentados por muitos animais em zoológicos.

A década de 1960 foi bastante profícua com relação aos progressos iniciais na área de bem-estar animal. Em 1961, dois estudantes de Skinner, Breland e Breland, treinaram porcos para colocar moedas plásticas em um “banco” como condição para receberem uma recompensa comestível. Treinaram também galinhas para “jogar” beisebol com uma bola de pingue-pongue. Os animais desempenharam com sucesso suas tarefas, mas após algum tempo, seus comportamentos começaram a se alterar. Os porcos, ao invés de colocarem as moedas no “banco”, começaram a vasculhar a pilha de moedas, enquanto as galinhas escolheram bicar as bolas ao invés de rebatê-las. Os autores atribuíram essas mudanças a tentativas, por parte dos animais, de reverter seu comportamento, para desempenhar comportamentos típicos de suas próprias espécies. Esse trabalho trouxe a consciência da importância do entendimento da história natural dos animais na elaboração de um projeto para melhoria dos seus níveis de bem-estar.

Outro psicólogo, Alan Neuringer (1969), demonstrou que quando é dada aos animais a oportunidade de escolha entre “trabalhar” para conseguir recursos alimentares ou acessá-los facilmente, muitos deles escolhem a primeira opção. Isso sugeria que os animais pudessem ter uma necessidade biológica da procura pelo alimento, entre outros tipos de comportamento, e que a negação dessa oportunidade poderia ser uma fonte de frustração e estresse (Hughes & Duncan, 1988). Foi a partir dessa época que os zoológicos começaram a incorporar o conhecimento da história natural dos animais no planejamento de seus recintos (Kortland, 1960; Reynolds & Reynolds, 1965; Freeman & Alcock, 1973), provavelmente influenciados pelo crescente interesse no bem-estar animal, estimulado pela publicação do livro *Animal Machines*, de Ruth Harrison (1964), pelo reconhecimento da necessidade da conservação de espécies ameaçadas através da reprodução em cativeiro e pelas pesadas críticas feitas aos sistemas intensivos de manejo de animais de produção, implantados para suprir as necessidades nutricionais pós-guerra (Young, 2003). Também datam dessa época os primeiros registros sobre comportamentos

estereotipados em animais de zoológicos na Alemanha (Meyer-Holzapfel, 1968), porém foi somente em 1973 que Charles Watson, então estudante da *University of Edinburg*, conduziu o primeiro estudo de enriquecimento ambiental em zoológico (Young, 2003).

A psicologia experimental, então, começou a estudar o enriquecimento ambiental para avaliar os efeitos deste durante o desenvolvimento ontogenético da aprendizagem e do comportamento social, investigando também suas repercussões na neuro-anatomia e neurofisiologia (Renner & Rosenzweig, 1987). Estudos fisiológicos em laboratório têm trazido luz à questão da efetividade de técnicas de enriquecimento ambiental para a promoção do bem-estar, bem como da observação de efeitos claramente mensuráveis, como o aumento nos níveis de noradrenalina (Naka et al., 2002), a redução na resposta ao estresse (Belz et al., 2003; Segovia et al., 2008), a redução na ansiedade (Iwata et al., 2007) o aumento nos níveis de neurotrofina (Turner & Lewis, 2003), a facilitação do desenvolvimento de animais jovens (Cheal et al., 1986), o aumento de peso sem um maior consumo de nutrientes (Van de Weerd et al., 1997), a redução dos efeitos danosos do isolamento social (Bredy et al., 2003), as alterações nos parâmetros de células sanguíneas (Wilson et al., 1999), o aumento da densidade celular cerebral (Johansson & Belichenko, 2002), a recuperação de danos neurológicos (Wagner et al., 2002; Berrocal et al., 2007; De Bartolo et al., 2008), a redução de danos estomacais (Pare & Kluczynski, 1997), a melhora na aprendizagem, memória ou cognição (Hoplight et al., 2001; Tang et al., 2001; Schrijver et al., 2002; Leal-Galicia et al., 2007; Cai et al., 2009; Harris et al., 2009), o aumento de peso e tamanho cerebral (Greer et al., 1981), recuperação de danos psicológicos (Koh et al., 2007; Hendriksen, 2009), aumento da plasticidade sináptica (Leal-Galicia et al., 2008) e a melhora na percepção visual (Prusky et al., 2000).

As propostas de trabalho na área baseiam-se, hoje, nas três grandes diferenças existentes entre os ambientes naturais e de cativeiro: a previsibilidade do ambiente do cativeiro, sua falta de complexidade e o tempo reduzido que o animal cativo gasta para se alimentar ou procurar por comida. Resultados desejáveis de uma intervenção seriam: a redução do comportamento anormal e da expressão de medo do tratador e do público e um aumento da atividade, de comportamento exploratório,

das brincadeiras, e da expressão de comportamentos naturais (Universities Federation for Animal Welfare [UFAW], 2000, p. 3).

Dentre os comportamentos citados como desejáveis, o exploratório é o mais comumente estimulado e está intimamente relacionado com o recolhimento de informações do ambiente. A exploração é utilizada para obter informações a respeito da disponibilidade de recursos para o futuro, esconderijos, pontos de fuga, além de alimento (Mench, 1998). Segundo Griffin (1991), através das informações obtidas, formam-se representações na mente do animal e isso pode promover um confronto da situação presente com memórias ou com a antecipação de situações futuras, levando a decisões sobre os comportamentos desejáveis.

Inversamente, níveis de estresse severos e crônicos, vistos em várias instituições mantenedoras de animais em cativeiro, podem levar à imunossupressão e à atrofia de tecidos (Munck et al., 1984), diminuir o sucesso reprodutivo dos animais (Liptrap, 1993; Dobson & Smith, 1995), e levar ao desenvolvimento de estereotipias (McBride & Cuddeford, 2001). Dantzer e Mormed (1983) definem estereotipias como um comportamento apresentado de maneira repetitiva e exagerada, muitas vezes associado ao tédio e a disfunções comportamentais do animal. Segundo Shepherdson (1998), as estereotipias podem ser quantitativas - superatividade, beber água em excesso, por exemplo, ou qualitativas - comportamentos que o indivíduo não apresentaria em natureza, tais como mastigação falsa; caminhar repetitivo e sem objetivo, conhecido como *pacing*, entre outros. São, enfim, séries de movimentos de todo ou parte do corpo do animal que são repetidos regularmente e que não servem a nenhuma função aparente. Entretanto, essa definição não é um consenso, sendo necessários trabalhos que contribuam para a compreensão de suas formas de exibição e de sua relação com o bem-estar. A função do comportamento estereotipado também não é clara. Segundo Bloomstrand et al. (1986), algumas estereotipias ocorrem como resultado da privação de estímulos e podem ser aliviadas com um aumento da complexidade temporal e espacial do ambiente. São ainda interpretadas como um recurso para o animal suportar um ambiente adverso, regulando o grau de excitação ou estimulação, aumentando a previsibilidade do ambiente ou tornando o indivíduo menos atento à condição adversa. Embora os mecanismos envolvidos no desenvolvimento de comportamento

estereotipados não sejam claros, há evidências suficientes de que sua apresentação está relacionada a um ambiente (físico, social) inadequado (para uma revisão, Mason, 1991)

A redução de comportamentos indesejáveis ou estereotipados já foi alcançada em trabalhos com diversas espécies silvestres: focas (Grindrod & Cleaver, 2001), leopardos (Markowitz et al., 1995), raposas (Dow, 1987), elefantes (Wells & Irwin 2008), pandas (Swaigood et al., 2001), lobos guarás (Prado et al., 2007), chimpanzés (Paquette & Prescott, 1988, Baker, 1997; Celli et al., 2003; Caws et al., 2008) e outras espécies de primatas (O'Neil et al., 1991; Bayne, 1993; Brent & Belik, 1997; Boinski et al., 1999b). O aumento da diversidade comportamental ou o aumento da exibição de comportamentos desejáveis também foram atingidos com diversas espécies de primatas (Platt & Novak, 1997; Ludes-Fraulob & Anderson, 1999; Fekete et al., 2000; Turner & Grantham, 2002; Basile et al., 2007; Dishman et al., 2009; Wells & Irwin, 2009), morcegos (Masefield, 1999), lêmures (Sommerfeld et al., 2006), ursos (Fischbacher & Schmid, 1999), coiotes (Shivik et al., 2009), raposas vermelhas (Kistler et al., 2009) e felinos (Markowitz & LaForse, 1987; Jenny & Schmid, 2002).

Outros trabalhos conseguiram juntar os benefícios de ambos os efeitos: o enriquecimento aumentou os níveis de atividade e a ocorrência de comportamentos exploratórios, com a concomitante redução de comportamentos atípicos e a inatividade em ursos (Forthman et al., 1992; Swaigood et al., 2001) e felinos (Carlstead et al., 1993a, 1993b; Shepherdson et al., 1993; Wielebnowski et al., 2002a, 2002b; Bashaw et al., 2003).

Entretanto outros estudos mostram que as técnicas não são eficazes em todos os contextos, nem para todas as espécies (Wiedenmayer, 1998; Liu et al., 2006; para uma revisão, veja Wells, 2009), havendo inclusive trabalhos que mostraram que o enriquecimento pode levar a resultados indesejáveis, devido ao excesso de estímulos (Souza, 2002, Hutchinson, 2005), à tentativa de estimular comportamentos atípicos (Wiedenmayer, 1998), pelo uso de estímulos inadequados (Lefebvre et al., 2009) e pelo uso de material incompatível com a espécie, podendo este causar alergias, ingestão, inflamações ou danos mecânicos (Bazille et al., 2001; Shomer et

al., 2001; Veeder & Taylor, 2009;), podendo inclusive levar os animais a óbito (Hahn, 2000).

Haveria, então, a necessidade de um estudo sistemático a ser feito com cada espécie, ou grupo de espécies, para validar técnicas de enriquecimento que fossem eficazes para aqueles animais e, se possível, contribuíssem para a compreensão dos processos envolvidos no estabelecimento de níveis adequados de bem-estar.

Alguns autores têm demonstrado a funcionalidade do enriquecimento ambiental com animais silvestres ao juntar indicadores comportamentais e fisiológicos, tais como níveis de cortisol plasmático ou fecal (Carlstead et al., 1993a, 1993b; Schapiro et al., 1993; Boinski et al., 1999a, 1999b; Ahola et al., 2000; Doyle et al., 2008, Shivik et al., 2009), resposta do sistema imunológico (Capitanio & Lerche, 1998; Schapiro et al., 2000), variações no peso sem aumento de consumo de nutrientes (Schapiro & Kessel, 1993).

O enriquecimento alimentar, em especial, tem mostrado resultados bastante positivos com carnívoros cativos, através de uma larga gama de estratégias. Presas artificiais móveis estimularam comportamentos naturais de forrageamento em servais (*Felis serval*) e guepardos (*Acinonyx jubatus*) (Markowitz & LaForse, 1987). Em tigres (*Panthera tigris altaica*), o comportamento estereotípico foi reduzido através do uso de alimentadores manipuláveis (Jenny & Schmid, 2002). Em lêmures, a atividade geral e a locomoção foi aumentada quando o alimento foi oferecido em caixas “self-service”. (Sommerfeld et al., 2006). Alimento escondido pelo recinto reduziu o comportamento estereotípico em ursos negros americanos (*Ursus americanus*).

Hormônios e bem-estar

Para a avaliação das condições de um animal mantido em cativeiro e de suas necessidades de melhora, podem ser usados registros de comportamento e/ou a fisiologia. Medem-se comumente, na abordagem fisiológica, parâmetros como níveis de certos esteróides no sangue, nas fezes ou na saliva, que se sabe estarem

associados ao estresse, pois são secretados em situações que envolvem ferimentos físicos ou a necessidade de lidar com desafios ambientais.

Componentes ambientais imprevisíveis promovem um “estado emergencial” que resulta em mudanças nos padrões endócrinos e metabólicos do organismo. A fisiologia define como “estressores” os estímulos ambientais que levam a uma alteração na homeostase e a resposta correspondente de um animal é conhecida como “resposta ao estresse” (Möstl & Palme, 2002). Sabe-se que o estresse “[...] é uma interação adaptativa, neuroendócrina e comportamental de um organismo, hígida ou patológica, aos desafios que potencialmente possam danificar o equilíbrio entre os sistemas internos” (Souza, 2002).

A noção de homeostase tem sido modificada pelas evidências de que os organismos apresentam uma maior tendência a viver sob elasticidade do que na tentativa de se aproximar de um ponto de equilíbrio (Souza, 2002). Quando em vida livre, um animal tem de atender a várias demandas, com atividades variadas, relacionadas à reprodução, aquisição de recursos, fuga de predadores etc. Para atender a essas demandas, uma dinâmica fisiológica pode valer-se de mecanismos de manutenção de constância quando estes têm relevância, mas ela muitas vezes segue suas próprias regras, dentro da estratégia abrangente e oportunista de prever os eventos contextuais e sincronizar-se a eles (Ades, 2004). Portanto, o ponto de equilíbrio parece não existir de forma absoluta, mas sim um dinamismo por onde os mecanismos de defesa podem se manifestar, com custo energético, adiando outras funções. Esta elasticidade, denominada “alostase” (Schulkin et al., 1998), permite que o organismo se adapte à demanda, mas quando os custos ultrapassam a capacidade de adaptação, ocorre um processo de dano e desencadeamento de processos bioquímicos, moleculares, sistêmicos, psíquicos e comportamentais que podem ir minando pouco a pouco a resistência do organismo. Esses danos são conhecidos como patologias associadas ao estresse (Mcewen, 1996). Dessa forma, a resposta ao estresse tem a capacidade ambígua de reparar e danificar, conforme as condições em que ocorrer e sua duração.

Em qualquer animal homeotermo, a alta eficiência da resposta ao estresse está sustentada por dois eixos: o simpático-adrenal-medular (SAM) e o hipotalâmico-

pituitário-adrenal (HPA). Ambos os eixos podem ser ativados pelos mesmos estressores físicos, mas com diferenças fundamentais na resposta aos estressores psicológicos (Sapolsky, 1992; Gerra et al., 2001). Os hormônios do eixo SAM conferem resposta rápida, explosiva e de grande custo energético para o organismo, ao ativar os sistemas cardiovascular, pulmonar, muscular e cerebral para uma ação rápida diante de perigo iminente. Há uma ativação simpática geral e a reação não se sustenta por muito tempo porque a elasticidade dos sistemas sob a influência desses hormônios é limitada (Gerra et al., 2001).

O eixo HPA confere dinâmica e velocidade por sua ação em cascata, envolvendo uma sequência complexa de eventos hormonais e neuro-hormonais, com vários pontos de retro-alimentação negativa, cuja finalidade última, acredita-se, é a mediação do controle da homeostase pelo cortisol (Souza, 2002).

Faz parte da cascata do eixo HPA a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) pela hipófise, que ativa células adrenais para a síntese e secreção de glicocorticóides, principalmente cortisol e corticosterona, em questão de minutos (Souza, 2002). Glicocorticóides são esteróides, assim chamados por apresentarem em sua composição um núcleo esteróide característico. Na maioria das espécies de mamíferos, o principal glicocorticóide secretado é o cortisol (Cooke et al., 2004). As ações clássicas dos glicocorticóides são modular a glicemia, mobilizar aminoácidos e modular a resposta imunológica (Eckert et al., 1988), resultando em alterações metabólicas relacionadas à produção de energia e no desvio de sua rota usual, evitando que esta seja gasta em processos fisiológicos desnecessários para a sobrevivência imediata em situações emergenciais, tais como digestão, crescimento e reprodução (Munck et al., 1984; Sapolsky, 1992).

Como um mecanismo fisiológico, o estresse não é necessariamente danoso (Moberg, 2000). Glicocorticóides são liberados em resposta a situações que não são normalmente consideradas negativas, incluindo corte, cópula e caça (Broom & Johnson, 1993). Além disso, hormônios cujos níveis se elevam durante períodos de estresse fazem também parte da cascata hormonal que promove o parto em algumas espécies (Möstl et al., 1985; Mclean & Smith, 2001). Durante curtos períodos de estresse, os glicocorticóides aumentam a aptidão do organismo através

da mobilização de energia (Raynaert et al., 1976). Entretanto, um nível de estresse severo e crônico (prolongados períodos com altas concentrações de cortisol) pode reduzir a aptidão individual pela imunossupressão e atrofia de tecidos (Munck et al., 1984). Além disso, o sucesso reprodutivo do animal decai (Liptrap, 1993; Dobson & Smith, 1995), havendo a possibilidade do surgimento de estereotipias (Mcbride & Cuddelford, 2001).

A mensuração dos hormônios glicocorticóides pode ser utilizada para monitorar a atividade adrenal e, dessa forma, o nível de um possível distúrbio fisiológico nos animais (Möstl & Palme, 2002), porém a coleta de amostras de sangue para dosagem hormonal, que frequentemente envolve confinamento e manejo dos animais, pode, por ela mesma, ser estressante e interferir nos resultados (Hopster et al., 1999; Cook et al., 2000). Dessa forma, métodos não invasivos de amostragem são mais indicados. Dentre estes, utiliza-se a determinação de metabólitos presentes na urina (Hay & Mormède, 1998; Monclus et al. 2006), saliva (Cooper et al., 1989, Menargues et al., 2008), leite (Verkerk et al., 1998, Kofler et al. 2007) ou fezes (Ziegler et al., 1996; Möstl & Palme, 2002; Schroll et al., 2005; Martinez-Mota et al. 2008; Bosson et al. 2009), sendo este último método o que mais vantagens oferece pela facilidade de coleta, e pela sua correlação positiva e intensa com os níveis de cortisol plasmático (Jurke et al., 1997; Whitten et al., 1998) que são, por conseguinte, fortemente correlacionados com alterações da intensidade de agentes estressantes (Line et al., 1987; Dettmer et al., 1996). Técnicas não-invasivas para monitoramento de glicocorticóides têm sido usadas extensivamente por pesquisadores e conservacionistas em várias espécies (para revisões, ver Touma & Palme, 2005; Schwarzenberger, 2007) e são, atualmente, largamente aceitas como efetivas para auxiliar na avaliação de níveis de bem-estar.

O conhecimento sobre os hormônios relacionados ao estresse é, portanto, essencial para áreas como a biologia da conservação, manejo de animais silvestres, em vida livre ou em cativeiro, ecologia comportamental e para estudos biomédicos (Boonstra & Singleton, 1993; Graham & Brown, 1996; Wingfield et al., 1997; Mashburn & Atkinson, 2004; Touma & Palme, 2005; Thiel et al., 2008).

Técnicas de monitoramento não-invasivo para avaliar a atividade adrenocortical de determinada espécie devem, contudo, ser utilizadas com cautela. Devido a diferenças existentes no metabolismo e/ou na excreção de metabólitos de glicocorticóides (MGC) entre espécies e entre os sexos dentro de uma mesma espécie (Palme et al., 2005), uma validação cuidadosa para cada espécie e sexo a ser estudado é obrigatória (Palme, 2005; Touma & Palme, 2005).

Perfis de resposta a desafios ambientais

O estudo do temperamento e das variações inter-individuais pertencem a áreas com grande potencial para promoção de melhores níveis de bem-estar em animais cativos e para atuar como ferramentas de conservação. Diferentes indivíduos apresentam traços de temperamento diversos e respondem ao estresse de cativeiro de forma diferente e este, através da seleção artificial, pode promover alterações permanentes nos temperamentos das espécies. Essas alterações reduzem a diversidade desses traços, diversidade esta que poderia ser crítica para o sucesso de programas de reintrodução de animais silvestres (McDougall et al., 2006), ou mesmo para a manutenção de seu bem-estar em cativeiro.

Em geral, pesquisas em comportamento tendem a focalizar em tendências centrais de traços de comportamento, dando menos atenção a variações individuais desses traços. Entretanto, aumentam as evidências de diversas áreas que indicam que indivíduos, ou mesmo populações inteiras, diferem em seus comportamentos de forma consistente (ciência animal: Boissy, 1995; Grandin, 1998; psicologia: Gosling, 2001; ciências do comportamento: Clark & Ehlinger, 1987; Koolhaas et al., 1999; ecologia evolutiva: Stamps, 1991; Wilson et al., 1994; Sih, Bell & Johnson, 2004). Essas diferenças comportamentais resultam de variações em traços de temperamento e podem afetar de forma significativa a forma como os indivíduos interagem com o ambiente (Armitage, 1986; Carlstead, Mellen & Kleiman, 1999b; Wielebnowski, 1999; Réale et al., 2000; Dingemanse et al., 2004). Diferenças no temperamento podem levar a diferenças individuais em padrões de comportamento relevantes para a conservação, tais como comportamentos de evitação da predação, forrageamento e exploração (Godin & Davis, 1995; Coss & Biardi, 1997; Coleman &

Wilson, 1998; Fraser et al., 2001; Dingemanse et al., 2003; Drent, van Oers & van Noordwijk, 2003).

Populações de animais em vida livre e em cativeiro podem apresentar rápidas mudanças no temperamento em consequência de aprendizado, desenvolvimento e evolução (Marliave, Gergits & Aota, 1993; Trut, 1999; Drent et al., 2003). Seres humanos podem, de forma intencional ou não, modificar temperamentos dos animais, e essas alterações são comumente um efeito colateral das atividades humanas, tais como a reprodução de animais em cativeiro e a criação artificial de filhotes (criação destes longe dos pais, através da alimentação artificial, conduzida por um ser humano). Uma potencial desvantagem da reprodução de animais em cativeiro é a mudança na trajetória evolutiva dos animais silvestres. Essa mudança pode resultar tanto das condições novas do cativeiro como das práticas de manejo que podem favorecer determinados genótipos ou fenótipos (Arnold, 1995; Carlstead, 1996; Gilligan & Frankham, 2003). Por exemplo, em geral, indivíduos muito ativos ou muito agressivos provavelmente enfrentarão mais dificuldades para se adaptar às condições de cativeiro que animais menos ativos ou agressivos. Dessa forma, a pressão seletiva irá agir em detrimento da agressividade e da atividade, comparativamente com outras características (Arnold, 1995; Carlstead, 1996; Gilligan & Frankham, 2003). Consequentemente, o cativeiro estaria exercendo uma pressão seletiva em favor de comportamentos que podem não ser adaptativos no ambiente natural da espécie (McDougall et al., 1999). Além disso, as condições de criação e as características do ambiente de cativeiro podem influenciar de forma intensa os níveis de estresse e bem-estar (por exemplo, a área do recinto para rinocerontes, Carlstead et al., 1999a; a presença de plataformas para raposas, Korhonen & Niemela, 1995), pois indivíduos respondem ao estresse de cativeiro de forma diferente (Arnold, 1995; Carlstead, 1996; Crockett et al., 2000).

Falamos aqui de uma “evolução contemporânea”, que se refere a mudanças evolucionárias que acontecem em períodos menores que 100 anos (Hendry & Kinnison, 1999; Stockwell, Hendry & Kinnison, 2003), possivelmente até no tempo de uma geração humana (Ashley et al., 2003).

As diferenças individuais, geradas ou não pelas pressões de cativeiro, podem ser avaliadas através da definição dos estilos de gerenciamento de estresse, ou *coping styles*. Segundo Koolhaas *et al.* (1999), diferentes reações a estímulos ambientais podem estar ligadas às diferentes estratégias para lidar com o estresse, sendo essas estratégias definidas como o esforço comportamental e fisiológico para lidar com a situação (Lazarus, 1966; Wechsler, 1995). Foi observado em várias espécies que sempre que estressores ambientais superam a capacidade de gerenciamento dos indivíduos, a saúde está em perigo (Koolhaas *et al.*, 1999). Dessa forma, informações sobre o mecanismo dessas estratégias para lidar com o estresse contribuem na promoção de melhores níveis de bem-estar. Um *coping style* pode ser definido como um conjunto coerente de respostas comportamentais e fisiológicas ao estresse, exibidas por um grupo de indivíduos. Esses traços parecem ter sido moldados evolutivamente e constituem padrões adaptativos gerais de reações aos desafios rotineiros em um habitat natural (Koolhaas *et al.*, 1999). Entretanto, a definição desses estilos implica na consistência das características ao longo do tempo e em diferentes contextos comportamentais e ecológicos (Clark & Ehlinger, 1987; Wilson *et al.*, 1994; Gosling, 2001; Sih *et al.*, 2004). Cannon (1915) definiu algumas características que estariam ligadas a um perfil ativo, relacionadas na época com as “Reações de Luta ou Fuga” (*fight-flight response*): controle territorial e agressão. O segundo tipo de resposta foi definido bem mais tarde por Engel e Schmale (1972), como resposta de “conservação-abstinência” (*conservation-withdrawal response*). Esse padrão de respostas era caracterizado comportamentalmente por imobilidade e baixos níveis de agressão. Essas estratégias eram utilizadas para avaliar o nível individual de agressividade (tendência a defender o território) em machos de roedores e foram, posteriormente, generalizadas para avaliar a forma como machos reagem a desafios ambientais em geral.

Seguindo essa linha, Koolhaas *et al.* (1999) classificaram as diferentes formas de reagir aos desafios ambientais em dois perfis – o proativo e o reativo. Esses perfis explicariam, não somente as diferentes reações aos mesmos estímulos, mas também as diferentes vulnerabilidades a doenças mediadas pelo estresse, uma vez que não são as características físicas de certo estímulo, mas sim a percepção que o

indivíduo tem desse estímulo que pode levá-lo ao desenvolvimento das respostas ao estresse. Além disso, o impacto de certo estímulo é determinado pela habilidade do organismo de lidar com a situação (Ursin 1995, 1998). Os fatores envolvidos no desenvolvimento de determinado estilo (proativo, reativo) seriam o genótipo, o desenvolvimento, as experiências prévias, o suporte social etc., e influenciam não somente as respostas comportamentais, mas também as respostas fisiológicas e neuroendócrinas. O estilo proativo estaria caracterizado pela necessidade de controle territorial e pela agressividade. Esses animais tenderiam a desenvolver rotinas facilmente, apresentam um tipo de comportamento mais rígido. Já o estilo reativo está caracterizado por baixos níveis de agressão e pela flexibilidade. Etologicamente falando, ambos os estilos podem ser úteis, dependendo das condições ambientais (Dingemanse, 2003). Por exemplo, animais agressivos têm mais sucesso sob condições estáveis, enquanto os não-agressivos lidam melhor em condições variáveis ou em ambientes imprevisíveis, por exemplo durante migrações (Oortmerssen & Busser, 1989). Os diferentes estilos de resposta a agentes estressantes foram observados em peixes (Overli et al., 2004, Schjolden et al., 2005), roedores (Koolhaas et al., 1999, Rödel et al., 2006, Vegas et al., 2006), aves (Carere et al., 2003), porcos (Wechsler, 1995) e humanos (Lazarus & Folkman, 1984).

Um aspecto complicador para a generalização dos conceitos acima é que, ao utilizar animais de origens, linhagens, gênero ou idades diferentes, o estabelecimento de estratégias específicas para lidar com estressores pode não ser preciso, devido à influência desses fatores. Entretanto em estudos com populações ferais, os perfis foram estabelecidos com sucesso (Koolhaas et al., 1999).

Após o desenvolvimento do campo conceitual dos *coping styles*, vários experimentos indicaram que os diferentes padrões comportamentais eram passíveis de serem considerados como *coping styles*, por terem sido desenvolvidos para controlar o ambiente. Trabalhos muito elucidativos (De Boer et al., 1990; Korte et al., 1992; Sgoifo et al., 1996) estudaram as reações de ratos machos a testes defensivos. Estes animais foram, inicialmente, classificados em proativos e reativos em testes prévios de defesa da gaiola contra um macho não-familiar. Na sequência, estes animais foram testados em um experimento em que o indivíduo era confrontado com

pequeno objeto eletrificado em sua gaiola. Como este objeto era novo para os animais, estes tendiam a explorá-lo de forma olfativa. Ao fazer isso, recebiam um pequeno choque. Assim que recebiam o choque, os animais tinham duas opções para evitar futuros choques: esconder-se no canto da gaiola ou, ativamente, cobrir o objeto com material para nidificação, disponível no compartimento. Observou-se que os machos agressivos despendiam a maior parte do seu tempo cobrindo o objeto, enquanto os não-agressivos ficavam imóveis. Cabe frisar que ambas as respostas levavam os animais a atingir o sucesso – ambas promoviam a evitação de futuros choques. Observou-se, ainda, que o comportamento de cobrir o objeto (estilo proativo) era seguido por baixas concentrações de corticosterona plasmática, enquanto a imobilidade (estilo reativo) estava associada a altas concentrações desse esteróide.

Foi relatado, então, que roedores (Sgoifo et al., 1997) e porcos (Ruis et al., 1999) proativos respondem a uma estimulação estressante com uma reatividade baixa do eixo HPA (baixas concentrações de corticosterona plasmática), associada com alta reatividade simpática. Em contraste, roedores reativos mostram alta reatividade do eixo HPA e alta reatividade simpática. Foi observada, também, em camundongos e ratos selvagens proativos, altos níveis basais de testosterona (Schuurman, 1981; Ruiters et al., 1992). Esses resultados apontam para um possível efeito amenizador da interação/atividade de evitação do agente estressor, o que pode ser interpretado como uma forma de lidar com o estresse.

Mason (1991), estudando estereotipias, relatou semelhantes efeitos, quando os animais exibiam comportamentos estereotipados, e relata que estes, quando impedidos de desempenhar as estereotipias, tendiam até a apresentar um aumento nas concentrações de MGC. O *pacing*, por exemplo, funcionaria como um comportamento recompensador e poderia, em alguns casos, inclusive melhorar os níveis de bem-estar em ambientes pobres (Mason & Latham, 2004).

O uso do enriquecimento ambiental para promoção de bem-estar em lobos guarás

Lobos guarás se alimentam de uma ampla gama de itens (Queirolo & Motta-Junior, 2007; Rodrigues et al., 2007) e, como onívoros, tendem a explorar seu ambiente de forma bastante intensiva. Dessa forma, estes animais podem ter seus níveis de bem-estar comprometidos se forem mantidos em ambientes com poucas oportunidades para exploração ou para exibição de comportamentos de forrageamento, análogos aos vistos em ambiente natural. A falta de complexidade de muitos ambientes de cativeiro mostrou gerar padrões de comportamento atípicos em lobos guarás. Bestelmeyer (1998) observou que o desempenho do *pacing* ocupou por volta de 1,25% do tempo dos animais (incluindo o tempo inativo). Esse tipo de comportamento (estereotipado) é observado somente em cativeiro e, embora no caso seja exibido com uma frequência relativamente baixa, pode ser considerado como indicativo de baixos níveis de bem-estar (Mason, 1991).

Carlstead e Kleiman (1998), com o propósito de generalizar técnicas de manejo para diferentes instituições mantenedoras de animais silvestres, observaram que os perfis comportamentais e fisiológicos individuais não poderiam ser desprezados, sendo necessário o entendimento dos mecanismos através dos quais os ambientes de cativeiro influenciam os indivíduos. Ao trabalharem com lobos guarás, observaram também que comportamentos indicativos de medo em fêmeas apresentavam relação com a forma como o animal havia sido criado (por seus pais ou por seres humanos), tendo as fêmeas criadas pelos pais exibido uma frequência maior desses comportamentos. Entretanto, o mesmo não aconteceu com os machos. Este estudo já trazia, então, uma indicação de possíveis diferenças entre as reações de machos e de fêmeas a estímulos ambientais, diferenças essas confirmadas posteriormente em outros estudos com a espécie (Cummings et al., 2007; Vasconcellos et al., 2009).

Alguns dos estudos que obtiveram como resultados aumento da atividade geral, redução de comportamentos estereotipados ou melhora do padrão comportamental em canídeos silvestres, através do aumento da exibição de comportamentos típicos, foram feitos com coiotes (*Canis latrans*, Shivik et al., 2009) raposas do deserto

(*Vulpes zerda*, Dow, 1987), raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*, Nimon & Broom, 2001; Kistler et al., 2009), raposas azuis (*Alopex lagopus*, Ahola et al., 2000; Korhonen & Niemela, 2000; Nimon & Broom, 2001) e cachorros vinagre (*Speothos venaticus*, Ings et al., 1997). Com lobos-guarás encontram-se os trabalhos de Daley and Lyndaker-Lindsey (2000), Cummings et al. (2007), e Vasconcellos et al. (2009).

Daley e Lyndaker-Lindsey (2000) reuniram informações sobre os tipos de enriquecimento, os itens utilizados e a frequência de aplicação desses enriquecimentos para 87 lobos guarás, em 27 zoológicos norte-americanos, mas não estudaram os efeitos desses procedimentos sobre o comportamento dos animais ou sobre seus níveis de bem-estar. Cummings et al. (2007) conduziram um experimento no qual as respostas fisiológicas e comportamentais imediatas ao enriquecimento eram acessadas em quatro lobos guarás cativos. As taxas de atividade e o comportamento exploratório dos lobos foram monitorados durante um período de 30 minutos, imediatamente à colocação do alimento escondido ou à apresentação de um objeto novo. Três dos quatro animais apresentaram um aumento na atividade e todos os quatro indivíduos apresentaram aumento em suas taxas exploratórias durante esse período de pós-introdução dos itens de enriquecimento. As concentrações de MGC aumentaram nos machos, mas não nas fêmeas. É essencial apontar que as alterações comportamentais promovidas neste estudo representaram um efeito em curto prazo, uma vez que as observações comportamentais eram feitas por apenas 30 minutos após a apresentação do enriquecimento. Semelhantes resultados não dão suporte à ideia de que o procedimento proporciona uma redução efetiva nos níveis de estresse ou uma melhora na qualidade de vida dos animais em longo prazo.

Em nosso estudo anterior (Vasconcellos et al., 2009), investigamos os efeitos do enriquecimento alimentar e exploratório em 11 animais, em três zoológicos, registrando o comportamento e dosando concentrações de MGC. Nossos principais achados foram: (1) a existência de dois perfis distintos de resposta hormonal (MGC) aos procedimentos experimentais, aproximadamente opostos; um de elevação e outro de redução nos níveis em resposta ao enriquecimento ambiental; (2) indicações de que os dois perfis observados pudessem corresponder a características ligadas ao gênero dos indivíduos; (3) um maior interesse pelo

alimento por parte dos animais de ambos os perfis, promovido pelo enriquecimento ambiental; (4) ausência de alteração comportamental global significativa (para a amostra como um todo) durante a fase experimental; (5) ausência de efeitos duradouros do enriquecimento.

Uma indicação de preferência em relação à disposição do alimento era observada em momentos em que os animais abandonavam os itens disponíveis em bandejas para procurar aqueles espalhados por nós pelo recinto. Esse dado reportava às colocações de Inglis e Ferguson (1986) a respeito do *contrafreeloading*, que ocorre quando os animais dão preferência ao alimento cujo acesso demanda esforço, abandonando a fonte que está facilmente acessível. Efeito semelhante já foi relatado para aves (Neuringer, 1969; Krebs et al., 1978; Inglis & Ferguson, 1986; Bean et al., 1999) e ratos (Jensen, 1963). Esses dados pareciam corroborar o Modelo das Necessidades Etológicas, conforme interpretação de Hughes e Duncan (1988), que defendem serem os animais reforçados, não somente pelas consequências funcionais de seus comportamentos (por exemplo, alimento e parceiros sexuais), mas também pelos próprios comportamentos empregados para atingir esses resultados (procurar, explorar, cavar etc.), bem como pela informação acessada através da exploração. Há bases, então, para pensar que, mesmo que os animais estejam bem alimentados e alocados confortavelmente, estes podem se beneficiar com a oportunidade de expressar comportamentos típicos da espécie e de entrar em contato com condições ambientais variáveis. Compartilhamos o ponto de vista de Dawkins (1990), que afirma que, embora os animais de cativeiro possam viver mais que os membros da mesma espécie que estão em vida livre, eles ainda são fortemente motivados a apresentar comportamentos como os utilizados para a exploração de território ou para evitar predação e irão sofrer por serem impedidos de apresentá-los.

Objetivos

Partindo dos resultados de nossos estudos prévios, pareceu-nos relevante abordar a questão do enriquecimento ambiental para o lobo guará dentro de uma perspectiva que levasse em conta as variáveis perfil individual e gênero, indo além do esquema

clássico de aplicação de técnicas a amostras de animais consideradas homogêneas. Acrescentamos, assim, a um procedimento de enriquecimento ambiental que controla os efeitos das técnicas em comparação com uma linha de base, através do acompanhamento comportamental e hormonal, testes de temperamento que pudessem informar sobre as tendências individuais, dentro de uma dimensão bipolar de cautela-exploração. Também pareceu-nos importante testar o valor do procedimento de enriquecimento, oferecendo aos animais a oportunidade de escolher entre a condição corriqueira de obtenção do alimento e a condição enriquecida em que o alimento, espalhado pelo recinto, gera respostas ativas de busca e forrageamento. Dessa forma, os objetivos deste estudo foram:

- Introduzir técnicas de enriquecimento ambiental centradas no alimento, avaliando as alterações comportamentais e hormonais em comparação com registros de linha de base, atentando em especial para as diferenças individuais e de gênero;
- Avaliar, por um teste de escolha, a preferência dos lobos guarás pela condição de enriquecimento (que envolve aumento da exigência de tempo e/ou esforço para a obtenção de alimento).
- Avaliar, através de um teste de exploração, perfis individuais de exploração/cautela que pudessem esclarecer a respeito da variabilidade, comportamental e hormonal, de resposta dos animais diante do enriquecimento.

Nossas hipóteses em relação ao efeito *global* do enriquecimento foram as seguintes: (a) o enriquecimento promoverá um aumento na apresentação de comportamentos relacionados ao forrageamento e à exploração e (b) uma redução na frequência de comportamentos indicativos de disfunção (*pacing*), (c) haverá preferência dos animais pela condição enriquecida em relação à condição usual de alimentação. Com relação às diferenças individuais, as nossas hipóteses foram: temperamento e gênero influenciarão as reações comportamental (d), e hormonal (e) ao enriquecimento (animais exploradores terão maior aumento de forrageamento durante fases de enriquecimento), assim como (f) a preferência dos animais pelo

contexto de enriquecimento (animais mais exploradores apresentarão preferência mais marcada pelo o contexto enriquecido, em testes de preferência).

MATERIAL E MÉTODO

Locais de estudo e amostra

Para a realização deste projeto de pesquisa, valemo-nos de 11 exemplares de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), sendo sete fêmeas e quatro machos, mantidos em pares ou em trios, com idades estimadas entre um e 11 anos, no momento do início do trabalho. Havia, entre os animais em estudo, indivíduos provenientes de vida livre e nascidos em cativeiro (Tabela 1), custodiados em três instituições: Zoológico de São Bernardo do Campo, no município de São Bernardo do Campo; Associação Mata Ciliar, em Jundiaí e Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, em Sorocaba, todos no Estado de São Paulo. O estudo foi realizado nos seguintes períodos: Zoológico de São Bernardo do Campo – Agosto/2005 a Janeiro/2006, Associação Mata Ciliar - Maio a Outubro/2007 e Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros Outubro/2007 a Fevereiro/2008. Devido ao degelo acidental do freezer que continha as amostras já coletadas até Novembro/2006, foi necessária a replicação do experimento no Zoológico de São Bernardo do Campo e na Associação Mata Ciliar - Julho a Dezembro/2007.

Tabela 1 – Sexo, alojamento, forma de criação e procedência dos lobos guarás utilizados no presente estudo.

Lobos	Indivíduo(s) no mesmo recinto	Sexo	Nomenclatura usada neste estudo	Nascimento em cativeiro (N) ou Captura (C) /Ano	Instituição	Número e Metragem dos recintos	Criação pelos pais (P) ou por humanos (H)
P	D	Macho	M1	N 1999	ZSBC	(1) 490 m ²	P
D	P	Fêmea	F1	N 1994	ZSBC	(1) 490 m ²	P
Lobão	Taigra	Macho	M2	C 1998	AMC	(2) 454 m ²	P
Taigra	Lobão	Fêmea	F2	C 1998	AMC	(2) 454 m ²	H
Apolo	Shiva	Macho	M3	N 2005	AMC	(3) 85 m ²	P
Shiva	Apolo	Fêmea	F3	N 2005	AMC	(3) 85 m ²	P
Thor	Ísis	Macho	M4	N 2002	AMC	(4) 99 m ²	H
Ísis	Thor	Fêmea	F4	N 2002	AMC	(4) 99 m ²	H
Ginga	Joana e Sorocaba	Fêmea	F5	C 2004	PZMQB	(5) 397 m ²	P
Joana	Ginga e Sorocaba	Fêmea	F6	C 1999	PZMQB	(5) 397 m ²	H
Sorocaba	Joana e Ginga	Fêmea	F7	C 2002	PZMQB	(5) 397 m ²	P

ZSBC= Zoológico de São Bernardo do Campo

AMC= Associação Mata Ciliar

PZMQB= Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros

Os animais estavam pareados, com exceção das fêmeas do recinto 5 (F5, F6 e F7, em trio). Todos os recintos (com tamanho variando de 85 a 490 m², Tabela 1) continham árvores e um espelho d'água, sendo cobertos ao menos em parte por vegetação rasteira. Com exceção dos recintos da Associação Mata Ciliar, que não recebia visitação pública regular (Recintos 2, 3 e 4), todos os recintos tinham recuo para o público de 1 metro. Os animais de recintos contíguos, que permitiam contato visual dos indivíduos em estudo eram passeriformes (recinto 1), os próprios lobos guarás (recintos 2, 3 e 4) e raposinhas do campo (*Lycalopex vetulus*, recinto 5). Todos os animais tinham acesso livre, durante 24 horas por dia, ao cambeamento (área de manejo) e à exibição (recinto principal). Os lobos eram alimentados uma vez ao dia, pela manhã, com refeições consistindo de frutas da estação (maçãs, bananas, mamões) e carne (coração bovino, pescoços de galinha, ração úmida ou ratos abatidos). Anteriormente ao início do estudo e durante as Linhas de Base (fases I e III), o alimento era disponibilizado em bandejas individuais, dentro da exibição.

Experimento de enriquecimento ambiental

Os procedimentos utilizados basearam-se na literatura sobre enriquecimento ambiental (Cummings et al., 2007; Hansen et al., 2007; Powell & Svoke, 2008), a biologia dos lobos guarás (Dietz, 1984; Bandeira de Melo et al., 2007; Queirolo & Motta-Junior, 2007), reações hormonais a desafios (Boinski et al., 1999b; Liu et al., 2006; Moreira et al., 2007), e observações pessoais. Considerando as sugestões de Saudargas e Drummer (1996), com a finalidade de eliminar o efeito de variáveis extra-estudo e de aumentar sua validade interna, repetimos a condição experimental (Linha de Base / Enriquecimento Alimentar / Linha de Base / Enriquecimento Alimentar). Os estudos foram conduzidos fora do período reprodutivo dos animais (Março a Abril, Carvalho & Vasconcellos, 1995), evitando assim interferências desta fonte de variabilidade comportamental e hormonal.

Durante todo o experimento (fases I a IV), os animais foram observados pelo método Animal Focal, tendo cada observação a duração de cinco minutos, com registros feitos a cada 30 segundos. Foram feitas oito observações de cada indivíduo em

cada dia de coleta: quatro imediatamente após a disponibilização da alimentação (manhã) e quatro no final da tarde (iniciando por volta de 15:30 horas), três vezes por semana, somente em dias úteis. Os indivíduos eram observados em sequência, sendo que ao final da série (ao ser observado o último dos indivíduos daquela instituição), imediatamente iniciava-se a observação do primeiro pela segunda vez, e assim consecutivamente. Nas instituições com menor número de indivíduos (dois – ZSBC e três – PZMQB), eram estipulados intervalos de cinco minutos entre as observações, de modo que a coleta de dados ocorresse aproximadamente nos mesmos horários em todas as instituições. A escolha do horário de início da segunda série de observações (tarde) se deu em função de observações prévias na Associação Mata Ciliar, instituição com o maior número de animais (através do método Grupo Focal, em que se registrava o número de indivíduos ativos – de um total de cinco, a cada quinze minutos, por três dias subsequentes) que demonstraram ser este o horário em que os animais iniciavam sua atividade crepuscular (Figura 1).

Figura 1 – Número de lobos guarás ativos por horário durante observações preliminares.

Os comportamentos foram registrados sistematicamente através de um computador de mão (Psion Workabout®, Psion Teklogix, Ontario, CA, USA), utilizando o programa de registros comportamentais *Observer* (Versão 3.0, Noldus Information Technology, BV, Wageningen, The Netherlands), filmadora e máquina fotográfica. Para análise, os comportamentos foram agrupados em categorias comportamentais, conforme Tabela 2.

Tabela 2 – Categorias comportamentais de lobos guarás utilizadas neste estudo.

Comportamento agonístico: Intra ou inter-específico; abrir a boca (voltado para outro indivíduo, como forma de ameaça – comportamento já descrito para a espécie [Rodden e Rosenthal 1995]), rosnar, latir, avançar, morder ou andar com os pêlos arrepiados;

Comportamento social não agonístico: Intra ou inter-específico; cheirar outro lobo; levantar o rabo sem rosnar; aproximar-se amigavelmente do tratador ou da doutoranda, apresentando comportamentos afiliativos, tais como abanar o rabo, ou encostar-se na pessoa para ser tocado. A marcação de território através da esfregação do pescoço ou dos órgãos genitais em objetos do recinto também foi considerada nessa categoria;

Forrageamento: Alimentar-se, manipular o alimento, revolver o substrato com o focinho, caçar insetos ou aves, enterrar ou desenterrar comida;

Exploração: Farejar o chão, as árvores, as folhagens;

Locomoção: Andar ou correr, desde que o animal não estivesse envolvido em nenhuma outra atividade (como forragear, por exemplo);

Brincadeira: Morder, jogar para o ar, perseguir ou saltar com um objeto, manipular objetos na vasilha de água. Voltar-se para outro indivíduo, abaixando a parte dianteira do corpo ou batendo a pata dianteira no chão (chamado para brincadeira, [Rodden & Rosenthal 1995]).

Descanso: Permanecer deitado com a cabeça levantada ou abaixada;

Não visível: Registrado quando, mesmo tendo a informação sobre a localização do animal (por exemplo, no cambeamento), não conseguíamos visualizá-lo;

Pacing: Ir e vir compulsivo em um pequeno espaço, sem função aparente;

Parado: Permanecer parado, em pé;

Outros: Comportamentos não relacionados nas categorias anteriores, tais como: coçar-se, lamber-se, beber água, bocejar, espreguiçar-se, defecar, urinar;

Amostras de fezes de todos os indivíduos eram coletadas durante todo o experimento de enriquecimento ambiental (fases I a IV), quatro vezes por semana, sempre pela manhã (entre 7:30 e 8:00 horas) para análise de MGC. Eram sempre selecionadas as amostras mais recentes, que eram em seguida identificadas,

homogeneizadas (maceradas manualmente, dentro de sacos plásticos) e congeladas (-20° C) para armazenagem até o processamento. No período da tarde, um pedaço de carne com corante artificial para fins alimentícios (Mix Coralim) era fornecido às fêmeas, para permitir a identificação das amostras fecais a serem coletadas no dia seguinte.

Embora tenham sido coletadas amostras fecais dos 11 indivíduos durante os experimentos, em decorrência da perda das amostras fecais já citada, o Experimento de Enriquecimento Ambiental foi conduzido uma segunda vez no Zoológico de São Bernardo do Campo e na Associação Mata Ciliar. Entretanto, por ocasião dessa segunda coleta, um dos animais (M3) havia sido transferido para outra instituição. Dessa forma, os resultados que dependiam de amostras fecais foram limitados a 10 indivíduos (7 fêmeas e 3 machos).

Fase I: Linha de Base

Foram efetuadas observações do comportamento dos lobos guarás em sua condição usual, sem intervenções. Esta etapa durou quatro semanas, e teve como finalidade estabelecer uma base comportamental e hormonal comparativa para os registros das fases posteriores.

Fase II: Enriquecimento

Utilizamos várias técnicas de enriquecimento alimentar, variando-as aleatoriamente (para cada instituição) no decorrer de quatro semanas. As técnicas utilizadas foram:

- Alimento dentro de caixas de papelão: o alimento era colocado dentro de uma caixa, que era preenchida com papel ou vegetação; em seguida, esta era fechada e inserida dentro de outra, aproximadamente do mesmo tamanho. Após esse procedimento, a caixa era amarrada com barbante plástico e disponibilizada no recinto (uma para cada indivíduo, Figura 2a);
- Alimento dentro de bolas feitas de cipó, preenchidas com palha ou vegetação (uma para cada indivíduo, Figura 2b);

- Alimento dentro de sacos de tecido ou ráfia, preenchidos com vegetação (um para cada indivíduo, Figura 2c);
- Alimento dentro de tubos de PVC com diâmetro de quatro polegadas, fechados em uma das extremidades (um para cada indivíduo, Figura 2d);
- Alimento escondido no meio da vegetação rasteira ou nas copas das árvores.

Figura 2 – Itens utilizados no enriquecimento alimentar para lobos guarás – alimento dentro de: (a) caixas de papelão, (b) bola de cipó; (c) saco de ráfia e (d) tubo de PVC.

Não houve variação no tipo de alimento apresentado: os alimentos utilizados para enriquecimento eram exatamente os mesmos (quantidade e diversidade) que os animais recebiam regularmente. Também não houve seleção de tipo de alimento para determinada técnica de enriquecimento. O enriquecimento consistiu, aqui, em intensificar os estímulos ao forrageamento e aumentar a complexidade do acesso à comida, aumentando também o tempo necessário para realização da tarefa de busca. No momento da colocação do alimento, os animais eram contidos, evitando assim pistas visuais sobre os locais onde estavam os alimentos ou sobre a forma de

acesso. Foi utilizada somente uma das modalidades de apresentação do alimento por dia de estudo, em ordem aleatória.

Fase III: Linha de Base

Durante esta fase, com quatro semanas de duração, foi retomado o procedimento da fase I, para verificar uma eventual persistência das mudanças comportamentais.

Fase IV: Enriquecimento

Repetiram-se os procedimentos da fase II, com a mesma duração, utilizando-se também em sequência aleatória os mesmos itens daquela fase.

Teste de Objeto Novo

Antes da execução do experimento de Enriquecimento Ambiental em cada uma das instituições, foram conduzidos testes de Objeto Novo (segundo as definições de Walsh & Cummins, 1976) para verificação de características individuais com relação à aproximação e investigação de um objeto desconhecido.

Seguimos os procedimentos de Bremner-Harrison et al. (2004), com pequenas modificações, para adaptar o teste à espécie em estudo. Todos os indivíduos foram submetidos a seis testes de Objeto Novo, que consistiam na apresentação de: um balão de papel colorido, um saco de ráfia cheio de papel, um boneco inflável, uma pilha de pneus e pessoas desconhecidas. Embora os diferentes estímulos possam ter valências diferentes para os animais, ou seja, um estímulo como o ser humano possa eliciar uma resposta mais intensa que um objeto inanimado, como os indivíduos foram submetidos à apresentação dos mesmos estímulos, essa diferença provavelmente não interferiu na comparação das respostas entre os indivíduos para seu ranqueamento. Antes do início do experimento, os animais eram contidos noambeamento, ocasião em que o objeto novo era colocado no recinto. Em seguida, os animais eram liberados e filmados por 15 minutos. Devido à estrutura de alguns recintos, que não permitiam a liberação isolada, aqueles que partilhavam o mesmo recinto eram submetidos ao teste conjuntamente.

Três sessões foram feitas antes de iniciar o Experimento de Enriquecimento (uma sessão por dia, iniciando sete dias antes do começo do experimento) e três após o final desse experimento (também uma sessão por dia, iniciando sete dias após a última das 16 semanas do experimento). Decidimos aplicar os Testes de Objeto Novo antes e após o Experimento de Enriquecimento para verificar possíveis efeitos desse procedimento nas reações dos animais à novidade. Utilizamos, durante o Teste de Objeto Novo, o método de observação Animal Focal, com registro contínuo. Todos os comportamentos que indicavam uma interação física ou visual dos animais com os objetos novos foram classificados em Exploratórios ou Cuidadosos, conforme Tabela 3.

Tabela 3 - Descrição das categorias comportamentais de lobos guarás utilizadas para caracterização dos comportamentos durante o Teste de Objeto Novo.

COMPORTAMENTOS EXPLORATÓRIOS	
Descansar relaxado, olhando para o objeto	Permanecer deitado em uma postura relaxada, com as orelhas levantadas, olhando para o objeto.
Investigar	Caminhar ou ficar parado enquanto fareja ou observa o objeto.
Aproximar-se do objeto	Caminhar diretamente na direção do objeto, olhando para este, orelhas e corpo ereto.
Tocar o objeto	Tocar e/ou mover o objeto com as patas ou com o focinho.
Brincar com o objeto	Morder, jogar para o ar, perseguir ou saltar com o objeto.
Marcar o objeto	Marcar o objeto com urina ou esfregar o corpo nele
COMPORTAMENTOS CAUTELOSOS	
Descansar alerta, olhando para o objeto	Permanecer deitado ou em pé, com as orelhas abaixadas, olhando o objeto.
Aproximar-se de forma hesitante	Caminhar lentamente em direção ao objeto, com frequentes avanços e recuos, orelhas e corpo abaixados, ou com os pelos eriçados.
Fugir	Correr ou pular em direção ao cambeamento, ou em direção oposta ao objeto.
Investigar de forma hesitante	Andar ou ficar em pé enquanto fareja, observa ou toca o objeto, com frequentes avanços e recuos, orelhas e corpo abaixados.
Esconder-se	Após ser liberado no recinto, retornar ao cambeamento e permanece lá.

Para avaliar o nível de “cautela” que os animais apresentavam diante de um objeto novo, foram mensuradas a distância mínima a que os animais chegavam do objeto novo e a latência para a saída dos animais após liberados (em número de corpos de

distância). Entretanto, os valores de latência não foram utilizados para análise, pois durante os testes observou-se influência da presença do tratador que liberava os animais no comportamento destes, ou seja, ao serem liberados alguns animais buscavam afastar-se rapidamente do tratador, o que pode ter diminuído a latência de saída desses indivíduos. Foi também calculado um Índice de Cautela, dividindo-se a proporção média de tempo que os animais despendiam em comportamentos Cuidadosos pelo tempo total despendido em interação com o objeto (Comportamentos Exploratórios e Cuidadosos) durante as seis sessões do teste, conforme fórmula abaixo.

$$IC = \frac{PC}{PC + PE}$$

IC: Índice de Cautela

PC: Proporção média de tempo dedicado a comportamentos cuidadosos durante as seis sessões

PE: Proporção média de tempo dedicado a comportamentos exploratórios durante as seis sessões

Os dados de todos os testes foram utilizados em conjunto (média) porque o objetivo, aqui, era caracterizar respostas à novidade, não a cada objeto específico (Powell & Svoke, 2008)

Teste de escolha

Ao final cada uma das semanas em que teve lugar o Experimento de Enriquecimento, foram efetuados Testes de Escolha com os animais, através da apresentação concomitante das duas formas de acesso ao alimento (a tradicional, em uma bandeja e com o alimento espalhado no meio da vegetação, demandando esforço para localização e acesso), adaptando às nossas condições os testes para verificação da existência de *contrafreeloading* utilizados por Bean et al. (1999).

O experimento foi feito semanalmente, por 16 semanas (durante todo o Experimento de Enriquecimento). Em cada sessão, os recintos eram divididos em duas metades por uma tela de nylon (Figura 3). Em uma das metades, o alimento era colocado em bandejas normalmente usadas para alimentação dos animais, uma para cada indivíduo (metade Bandeja). No outro lado, a mesma quantidade de alimento era espalhada em locais variados, no meio da vegetação (metade Espalhada). O acesso a ambas as metades era livre durante todo o teste, ou seja, os animais podiam, mesmo tendo escolhido uma determinada metade, se deslocar para a outra e voltar livremente. As duas metades (Bandeja e Espalhada) eram alternadas a cada sessão, para evitar um viés de lateralidade, e os animais eram mantidos dentro do cambeamento antes do início do experimento. Todos os indivíduos já haviam sido submetidos ao enriquecimento ambiental previamente, estando então familiarizados com a localização do alimento através do cheiro, e com o uso de suas patas e focinhos para acessá-lo. Do local onde os animais eram liberados, eles podiam visualizar as bandejas em uma das metades e, então, escolher entre as duas formas de forrageamento.

Figura 3 – Esquema de divisão dos recintos para o Teste de Escolha com lobos guarás. Na metade Bandeja, o alimento era colocado em bandejas (uma para cada indivíduo) e, na metade Espalhada, os itens alimentares eram espalhados no meio da vegetação.

A quantidade e a variedade de alimento disponibilizado em ambas as metades eram exatamente as mesmas. Os animais tinham livre acesso à alimentação por 30 minutos, período em que eram filmados. Findo este período, eles eram novamente contidos para retirada das sobras alimentares.

Três variáveis foram avaliadas: o tempo despendido e a quantidade de alimento consumida em cada uma das metades, e a metade para onde os animais se dirigiam para iniciar a alimentação assim que eram liberados.

Devido a um conflito de dominância muito pronunciado nas três fêmeas do Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros (F5, F6 E F7), estas foram excluídas da amostra deste experimento. Dessa forma, trabalhamos com oito lobos guarás, alocados em casais.

Considerando a hipótese de haver interferência de uma possível dominância nas escolhas dos outros indivíduos que estavam pareados, foi verificado o número de vezes em que cada indivíduo era o primeiro a escolher a metade onde iria iniciar sua alimentação. Verificou-se, ainda, a ocorrência de interações agonísticas e se havia recorrência no indivíduo que iniciava tal interação.

Extração e radio-imunoensaio (RIE)

Utilizamos, como em nosso trabalho anterior (Vasconcellos et al., 2009), um método não-invasivo que se mostrou eficaz para monitoramento da intensidade da resposta a alterações no nível de estresse dos indivíduos frente a um ambiente enriquecido: a extração e dosagem de MGC. Foram utilizadas amostras recentes, logo do início da manhã, que foram acondicionadas em sacos plásticos do tipo *ziplock* e, após a identificação como nome do indivíduo e data, foram então mantidas a -20°C até serem remetidas ao Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para extração e dosagem.

Extração hormonal

Foram feitas extrações dos MGC de 800 amostras, segundo os procedimentos empregados por Ziegler *et al.* (1996). Foram adicionados 5ml de etanol 80% (80% etanol: 10% água destilada - Merck®) a uma alíquota de 0,2g de fezes liofilizadas. Após homogeneização em aparelho vortex (Phoenix, Mod. AT56) por 15 minutos, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 RPM (Fanem) e o sobrenadante foi recuperado e armazenado em eppendorfs. As amostras foram diluídas em tampão gelatina pH 7,00 [NaPO₄ (13,8g), NaCl (9,0g), azida sódica (1,0g), gelatina (1,0g) e água destilada (1000ml)], em proporções que variaram entre 1/10 e 1/100 antes da dosagem.

Quantificação hormonal

Para as dosagens dos metabólitos hormonais foram utilizados conjuntos diagnósticos comerciais de duplo anticorpo (MP Biomedicals, Irvine, CA), que utilizam o I¹²⁵ como elemento traçador. A quantificação hormonal foi feita por radio-imuno ensaio (RIE), num contador de radiação Gama (Packard Cobra Auto-Gamma®), verificando o número de contagens por minuto (cpm). O resultado foi fornecido em ng/ml (nanogramas por mililitro), pré-estabelecido pelo protocolo do conjunto diagnóstico. Os valores finais de MGC foram corrigidos para peso e diluição através da fórmula abaixo e expressos em ng/g (nanogramas por grama de fezes úmidas), convertidos finalmente em µg/g – microgramas por grama de fezes liofilizadas.

$$\frac{C \times V_{fe} \times D \times [1+(1-R)]}{P_{is}}$$

C= Concentração determinada (resultado do RIE) em unidades (ng/ml)

V_{fe}= Volume obtido ao final da extração (ml)

D= Diluição

P_{is}= Peso inicial das fezes úmidas (g)

R= Índice absoluto de recuperação.

Para cálculo da fórmula acima, consideramos 1 como índice absoluto de recuperação (R). O cálculo exato desse índice não pôde ser feito, pois não dispúnhamos de cortisol marcado por Trício; entretanto, julgamos que esse procedimento não tenha prejudicado nossas análises, pois os procedimentos de recuperação de extrações feitas no Laboratório de Dosagens Hormonais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LDH / FMVZ / USP) com o hormônio triciado já foram realizados diversas vezes (Viau, 2003; Berbare, 2004), chegando a variações não significativas, com percentuais entre 89% e 92% aproximadamente, através de um protocolo padronizado. Cabe considerar ainda que as extrações foram todas feitas pela doutoranda e as dosagens pelo mesmo técnico, o que diminui as possibilidades de variação. Nossas interpretações foram feitas utilizando os valores relativos, ou seja, utilizamos as alterações nos perfis individuais de metabólitos ao longo do tratamento, não sendo necessária a aferição de valores absolutos.

Foi feita validação fisiológica do RIE (Desafio de ACTH) para a espécie em estudo. Esta validação, largamente utilizada em estudos hormonais (Dias et al., 2008; Knott et al., 2008; Leche et al., 2009), envolve o monitoramento de MGC fecais antes e depois da administração exógena de ACTH (Hormônio Adrenocorticotrófico, proteína normalmente liberada pela adenohipófise em resposta a eventos estressantes e eliciadora das reações ao estresse), para demonstrar a relação temporal entre mudança na atividade adrenal e a concentração de MGC nas fezes (para descrição detalhada dos procedimentos e resultados, ver Apêndice A).

Foi verificado um paralelismo entre as curvas de diluição de metabólitos de corticosterona e do conjunto comercial, com $r=0,998$ e $P<0,0001$. A sensibilidade do Radio-Imuno Ensaio foi de $0,22 \mu\text{g/g}$. O coeficiente de variação intra-ensaio baixo foi de 2,49% e intra-ensaio alto, 6,65%.

Análises estatísticas

Todos os dados foram submetidos a teste de normalidade (*Kolmogorov-Smirnov*) previamente à análise estatística e, na sequência, foram conduzidos os testes adequados, com distribuição bicaudal.

Os resultados comportamentais e hormonais do Experimento de Enriquecimento Ambiental foram analisados comparativamente entre as fases, para detectar eventuais alterações decorrentes da introdução dessas técnicas. Foram verificados possíveis efeitos da intervenção como um todo e de cada uma das fases para cada indivíduo. Por tratarem-se de dados longitudinais, utilizamos para análise dos dados ANOVAs de Medidas Repetidas por fase (considerando o conjunto dos dados de todo o dia, assim como cada período de observações em separado – manhã e tarde), usando as médias individuais. Para alterações consideradas significativas pela ANOVA, através das fases de tratamento, foi feito um teste *post hoc* (Dunnett) comparando a fase detectada com a fase I (Linha de Base). Para dados não-normais, foi feito o teste Friedman, com o *post-hoc* Dunn.

Foi feita análise com o *General Linear Model* (GLM), utilizando os indivíduos como fator randômico, (calibrando assim o teste para medidas repetidas) para comparação das concentrações médias de MGC nas diferentes fases do experimento e para a verificação de possíveis interações do gênero dos animais sobre esses dados (variável independente). O efeito do gênero, da forma de criação (pelos pais ou por seres humanos) e da idade dos animais também foram verificados (variáveis independentes) sobre as concentrações basais de MGC através deste teste. Verificamos ainda o efeito do gênero, da forma de criação, da idade e do IH sobre os perfis comportamentais (IC).

Uma Anova-I Fator foi usada para comparar as concentrações de MGC dos indivíduos, seguida do pós-teste *Bonferroni*.

O Teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparar os grupos com diferentes respostas de forrageamento ao enriquecimento ambiental.

Utilizamos a Correlação de *Spearman* ou *Pearson* para verificar a correlação entre as concentrações de MGC do macho e da fêmea durante o Desafio de ACTH, entre as concentrações de MGC e as diferentes categorias comportamentais e entre a distância mínima a que os animais chegaram no Teste de Objeto novo e o IC.

A Correlação de *Pearson* foi usada para verificar a ocorrência de correlação entre as concentrações basais de MGC e Índice de Cautela, e entre esse Índice e o aumento médio de Forrageamento durante o enriquecimento.

O Teste T-pareado para comparar os dados provenientes do Teste de Escolha (consumo, tempo e número de escolhas) de cada uma das metades do recinto, para a comparação das reações dos animais nos testes de Objeto Novo antes e depois do experimento de Enriquecimento Ambiental, e também comparando suas performances na primeira e na terceira sessão.

Nos testes em que foram feitas várias comparações (11 categorias comportamentais), foi aplicada a correção de *Bonferroni* ao nível de significância, ficando este reduzido para $P \leq 0,0045$. Nas demais análises, consideraram-se significantes resultados com $P < 0,05$.

Os testes foram feitos utilizando os programas GraphPad InStat (versão 3.00, GraphPad Software Inc. 2000), Minitab Statistical Software (versão 13.20, 2000) e SPSS (version 17.0, SPSS Inc., 2008).

RESULTADOS

Teste de Objeto Novo

Foram registrados os maiores valores médios de distância mínima entre os animais e os objetos novos nas sessões em que se testava a reação dos animais à presença de pessoas desconhecidas (Apêndice D). Esses valores variaram de 0,55 (pilha de pneus) a 5,89 corpos de distância (pessoa desconhecida). Registramos correlação significativa entre dessas distâncias com o IC dos animais ($P = 0,0386$, $F = 0,7329$).

Os Índices de Cautela variaram entre 0,007 e 1,000. Não houve alteração significativa nas reações dos animais aos objetos novos em função de uma possível habituação, comparando-se seus escores no primeiro e no terceiro experimento de cada série ($P = 0,92$ para o grupo como um todo; $P = 0,61$ para as fêmeas e $P = 0,47$ para os machos). Também não foi detectada alteração nessas reações em função da aplicação do enriquecimento ambiental, comparando-se os escores médios nas três sessões feitas antes do experimento de enriquecimento com os escores das três últimas sessões, feitas depois do enriquecimento ($P = 0,12$ para o grupo todo; $P = 0,69$ para fêmeas e $P = 0,17$ para machos). Também não foi observada correlação entre os Índices de Cautela e as concentrações basais de MGC ($P = 0,51$ para o grupo todo; $P = 0,59$ para fêmeas e $P = 0,78$ para machos). Os diferentes ICs apresentados pelos animais não puderam ser explicados pela idade dos animais ($P = 0,680$; $F = 0,17$), nem pela sua origem (se de cativeiro ou de vida livre, $P = 0,150$; $F = 2,16$). Mas, a forma de criação destes teve influência significativa no IC ($P = 0,001$; $F = 27,03$).

Efeitos comportamentais

Para a análise das reações comportamentais ao enriquecimento, consideramos a média de cada categoria comportamental individual por etapa do experimento (fases I a IV, utilizando os registros feitos durante todas as oito observações diárias).

Encontramos alteração significativa na categoria Forrageamento (ANOVA de Medidas Repetidas, $P < 0,0001$, $F = 13,637$), tendo havido aumento significativo de frequência nas duas etapas de enriquecimento (fases II e IV, Figura 4) em comparação com as fases I e III.

Figura 4 – Frequência média (+erro padrão) de Forrageamento para a amostra completa de lobos guarás durante as observações do dia inteiro, nas fases I a IV. Barras com letras diferentes apresentam diferença significativa ($P \leq 0,05$)

Para verificar se o aumento de Forrageamento ocorreu de forma localizada imediatamente após a disponibilização do alimento ou se este se prolongou até o período da tarde, analisamos separadamente os quatro períodos de observação realizados imediatamente após a disponibilização do alimento (manhã) e os quatro períodos de observação realizados várias horas depois da colocação do alimento (tarde).

Houve diferenças significativas entre fases nas observações realizadas imediatamente à colocação do alimento ($P = 0,0006$; $F = 7,843$). Embora os dados médios indiquem aumentos nas fases II e IV, em relação, respectivamente, às fases I e III, o aumento só foi significativo na fase IV em relação às fases I e III, (Figura 5a).

Nos períodos de observação da tarde, algumas horas depois da colocação do alimento, observou-se uma diferença no Forrageamento entre as fases. Estatisticamente, houve uma tendência de aumento de frequência na fase II em relação às fases I e III ($P = 0,0145$; $F = 4,206$, Figura 5b).

Figura 5 – Frequência média (+erro padrão) de Forrageamento para a amostra completa de lobos guarás durante as observações matutinas (a) e vespertinas (b), nas fases I a IV. Barras com letras diferentes apresentam diferença significativa ($P \leq 0,05$)

Quando consideramos os indivíduos em separado, alguns deles apresentaram outras alterações comportamentais significativas em resposta aos procedimentos

experimentais, tais como redução do *Pacing* em alguma das fases do enriquecimento ou aumento do Forrageamento (Tabela 4).

Tabela 4 - Resultados significativos da ANOVA de Medidas Repetidas / Friedman sobre as categorias comportamentais dos lobos guarás, ao longo das quatro condições experimentais (fases I a IV, $P \leq 0,0045$). À ANOVA / Friedman seguiu-se pós-teste Dunnett / Dunn comparando cada uma das condições com a fase I.

Categoria	Lobo	<i>P</i>*	Fase alterada	Alteração
Parado	M2	0,0002	IV	Aumento
Parado	F2	0,003	III, IV	Aumento
<i>Pacing</i>	F2	0,0001	III, IV	Redução
<i>Pacing</i>	F6	0,003	II, IV	Redução
Não visível	M1	0,004	III	Aumento
Não visível	F6	0,0002	III, IV	Aumento
Forrageamento	F1	0,002	IV	Aumento
Outros	F2	0,003	II	Aumento
Descanso	F6	0,001	III	Redução

*Nível de significância= $P \leq 0,0045$.

Efeitos hormonais

Não se observou diferença significativa entre as médias das concentrações de MCG da amostra completa nas diferentes fases do experimento ($P = 0,5071$; $F = 0,7956$). A curva dos valores médios ($N = 10$, Figura 6) não indica um decréscimo de MCG da fase I para a fase II e nem da fase III para a fase IV. A figura não indica tampouco que houvesse na segunda aplicação dos procedimentos (fase III / fase IV) replicação dos resultados obtidos na primeira (fase I / fase II).

Figura 6 - Concentrações médias (+erro padrão) de MGC de toda a amostra de lobos guarás durante as quatro fases do Experimento de Enriquecimento (fases I a IV).

Houve variabilidade interindividual marcada nas concentrações de MGC (Figura 7). Somente em três indivíduos se observou resposta à segunda aplicação do tratamento (fases III / IV) semelhante à da primeira aplicação (fase I / fase II), indivíduos M4, F4 e M6. Todos os animais apresentaram diferenças significativas com relação a, ao menos, um outro indivíduo da amostra ($P < 0,0001$; $F = 18,007$ – Apêndice C).

Figura 7 - Concentrações médias individuais (+erro padrão) de MGC dos lobos guarás durante todas as fases do experimento de enriquecimento (I a IV). Barras com letras diferentes apresentam diferença significativa entre si ($P \leq 0,05$).

Houve interação entre as concentrações de MGC e o gênero dos animais ($P = 0,041$; $F = 3,24$, Figura 8). Essa interação parece ser devida aos valores de MGC dos machos na fase III.

Figura 8 - Concentrações médias de MGC de machos e de fêmeas dos lobos guarás em todas as fases do Experimento de Enriquecimento (fases I a IV).

Não tendo havido replicação dos resultados observados na primeira aplicação do tratamento (fase I / fase II) na segunda (fase III / fase IV) para todos os animais, consideramos que a ausência de uma replicação dos resultados observados na primeira aplicação do enriquecimento (fase I / fase II) possa ter se dado em função da dependência dos dados (ou seja, que um efeito hormonal obtido na primeira aplicação tenha influenciado as concentrações hormonais nas fases III e IV). Entretanto, a razão para esse possível efeito não é clara. Dessa forma, investigamos mais de perto, através do IH, a reação à primeira aplicação do enriquecimento, uma vez que, havendo um efeito da novidade do procedimento, este provavelmente se daria de forma mais intensa na primeira aplicação do procedimento.

optamos por centrar a análise na primeira aplicação. Para tanto, calculamos a média individual de concentrações de MGC durante a fase I e durante a fase II. Em seguida, dividimos a média individual de MGC na fase II pela média durante a fase I, estabelecendo assim um Índice hormonal (IH) individual de resposta ao enriquecimento.

O Índice Hormonal variou entre os animais de 0,71 a 2,69 (Figura 9). Este Índice não se mostrou influenciado pela forma de criação dos animais (se pelos pais ou por seres humanos, $P = 0,160$; $F = 2,40$).

Figura 9 - Concentrações médias individuais de MGC (+erro padrão) durante as fases I e II do Experimento de Enriquecimento com lobos guarás.

Interações entre fatores

As concentrações basais de MGC também não apresentaram influência da forma de criação ($P = 0,536$; $F = 0,42$).

Realizamos também análises relativas ao experimento de Objeto Novo comparativamente com os resultados hormonais (IH), considerando o gênero dos animais. Essa análise demonstrou haver o efeito de uma interação entre o IC e o gênero dos animais sobre o IH ($P = 0,002$; $F = 10,73$, Tabela 7).

Tabela 7 - Índices de Cautela e Hormonal dos lobos guarás.

Animais	IC	IH
M4	0,02	0,71
F2	0,04	0,85
M1	0,57	0,75
F7	1,00	0,82
F3	0,87	0,87
F1	0,64	0,88
M2	0,92	1,36
F5	0,57	1,36
F6	0,41	2,53
F4	0,01	2,69

Dessa forma, confirmada essa interação, nosso próximo passo foi fazer a análise de cada gênero em separado. Nessa análise, eliminou-se da amostra de fêmeas um indivíduo que, próximo ao final do estudo, foi diagnosticado como apresentando doença cardíaca e ascite (F2) e que, devido às doenças que, embora diagnosticadas ao final do experimento, já vinham em progresso, pode ter apresentado resultados hormonais incompatíveis com os típicos da espécie. Além disso, uma vez feito o diagnóstico, ao animal passaram a ser administrados os seguintes medicamentos: Furosemida, Enalapril e Digoxina, este com efeitos já demonstrados nas concentrações de glicocorticóides (Kau et al., 2009). Verificou-se, nas seis fêmeas remanescentes, uma correlação negativa entre os Índices Hormonal e de Cautela (Spearman, $P = 0,0028$; $r = -1,00$, Figura 10a). As fêmeas exploradoras (que despenderam menos de 50% do tempo de interação em comportamentos

cuidadosos) reagiram ao enriquecimento com um aumento nas concentrações de MGC, enquanto as fêmeas cuidadosas (que despenderam mais de 50% do tempo de interação em comportamentos cuidadosos) reagiram com um decréscimo. Não foi encontrada semelhante correlação na amostra de machos ($P = 0,3333$; $r = 1,000$, Figura 10b).

Figura 10 – Correlação entre os Índices de Cautela e Hormonal das fêmeas (a) e dos machos (b) de lobos guarás.

Embora não se tenha observado correlação entre a frequência de Forrageamento (média das fases II e IV / média das fases III e I) e o Índice de Cautela ($P = 0,22$), notou-se que os indivíduos que apresentavam Índices Hormonais abaixo de 1, ou seja, redução nas concentrações de MGC em resposta ao enriquecimento foram justamente os que apresentaram aumento significativo na exibição de comportamentos ligados ao Forrageamento em alguma das etapas de enriquecimento (fases II ou IV), quando o desempenho desses animais é analisado em separado (Tabela 5). Os dados de Forrageamento desses indivíduos, quando agrupados, apresentam diferença significativa entre as fases de Linha de Base (fases I e III) e Enriquecimento (fases II e IV, Teste T Pareado, $P = 0,0011$). Em contrapartida, o grupo remanescente, quando analisado separadamente, não apresenta diferença significativa ($P = 0,25$). Os grupos se mostraram, ainda, significativamente diferentes (Mann Whitney, $P = 0,0095$) em sua reação de forrageamento ao enriquecimento. Parece-nos bastante instigante e merecedora de

mais estudos esta associação entre a redução nas concentrações de MGC e o aumento do Forrageamento diante de uma condição de enriquecimento.

Tabela 5 - Aumento na frequência do Forrageamento dos lobos guarás nas fases II e/ou IV em comparação com o Índice Hormonal.

Índice hormonal – fase II/fase I)	Hormonal (Reação ao enriquecimento)	Aumento significativo frequência Forrageamento	Indivíduos na de
<1		Sim	M4, F2, M1, F7, F3, F1
>1		Não	M2, F5, F6, F4

Correlações entre MGC e comportamentos

Considerando o nível de significância corrigido para as comparações múltiplas ($P \leq 0,0045$), nas correlações entre as concentrações de MGC e as categorias comportamentais (Tabela 6), somente a categoria Outros apresentou correlação significativa (positiva), observando-se uma tendência à correlação negativa na categoria Forrageamento ($P = 0,0088$ / $r = -0,4087$), conforme observa-se na Figura 11.

Tabela 6 – Correlações de Pearson ou Spearman entre as concentrações de MGC e as categorias comportamentais registradas nos lobos guarás avaliadas neste estudo.

Categoria comportamental	Correlação	<i>P e r</i>
Comportamento agonístico	Spearman	$P = 0,0692 / r = -0,2903$
Comportamento social não agonístico	Pearson	$P = 0,8341 / r = -0,0342$
Forrageamento	Pearson	$P = 0,0088 / r = -0,4087$
Exploração	Pearson	$P = 0,4833 / r = 0,1141$
Locomoção	Pearson	$P = 0,5481 / r = -0,09785$
Brincadeira	Spearman	$P = 0,0896 / r = 0,2719$
Descanso	Pearson	$P = 0,9483 / r = -0,01060$
Não visível	Pearson	$P = 0,1761 / r = 0,2182$
<i>Pacing</i>	Pearson	$P = 0,0775 / r = 0,2824$
Parado	Pearson	$P = 0,0387 / r = -0,3282$
Outros	Spearman	$P = 0,0040 / r = 0,4455$

*Nível de significância= $P \leq 0,0045$.

Figura 11 – Correlação entre as concentrações de metabólitos de glicocorticóides (MGC) e a frequência relativa de Forrageamento de lobos guarás.

Teste de Escolha

Não houve diferença significativa entre o número de escolhas iniciais dos animais em cada uma das metades do recinto (a metade que continha as bandejas ou a metade que continha o alimento espalhado, $P = 0,3899$, $t = 0,9165$, Figura 12). Foi observado, na verdade, um viés de lateralidade na primeira escolha dos animais: a maioria deles tendia a começar a se alimentar sempre do mesmo lado do recinto (direito / esquerdo) assim que eram liberados. Como as metades (Bandeja e Espalhada) eram revezadas em cada sessão, ou seja, na sessão 1 a Bandeja ficava do lado direito, na sessão 2, ficava do lado esquerdo, e assim por diante. Dessa forma, o indivíduo que tendia a começar a se alimentar sempre pelo lado direito iria começar, em média, em 50% das sessões em cada uma das metades, e vice-versa.

Figura 12 – Soma das escolhas iniciais de cada um dos lobos guarás em cada um das metades do recinto (Bandeja e Espalhada) ao longo das 16 semanas do Teste de Escolha.

Em geral, não houve diferença no número de sessões em que cada lobo guará foi o primeiro a escolher a metade do recinto em que iria iniciar sua alimentação (Tabela 8). Na maioria das sessões, ambos os indivíduos que estavam pareados faziam suas escolhas concomitantemente. O único caso discrepante (M2/F2) ocorreu devido às características do recinto onde os animais estavam alojados – não era possível liberar a ambos ao mesmo tempo, sendo a fêmea F2 sempre liberada alguns segundos após o macho M1. Com todos os pares houve sessões em que ambos, quando faziam a primeira escolha, optavam pela mesma metade do recinto (nove vezes para o par M1/F1 e três vezes para os outros pares), se alimentando ambos em proximidade física. A ocorrência de interações agonísticas era baixa – à média de uma interação leve (rosnado) a cada três sessões, não havendo prevalência no indivíduo que iniciava a interação, conforme já relatado por Dietz (1984). Normalmente, o indivíduo que primeiro se acercasse do alimento permanecia se alimentando, mesmo que o outro se aproximasse. Nos casos em que ocorreu interação agonística, aquele que estava se alimentando, ao sentir a aproximação do outro, rosnava para ele, o outro se afastava e o primeiro seguia se alimentando.

Esses dados indicam ser pouco provável que tenha havido interferência social significativa nas escolhas, consumo e/ou permanência nas metades do recinto.

Tabela 8 – Número de sessões em que cada lobo guará foi o primeiro a fazer a escolha e número de sessões em que ambos escolheram a mesma metade, durante as 16 sessões do Teste de Escolha.

	1ª escolha	1ª escolha compartilhada
M1	1	9
F1	0	9
M2	13	3
F2	1	3
M3	2	3
F3	0	3
M4	2	3
F4	2	3

O consumo por indivíduo foi calculado como metade do consumo total médio porque os animais estavam alocados aos pares e não havia possibilidade de acessar a quantidade consumida por cada um dos indivíduos. Houve sobras em ambas as metades em 80% das sessões. Novamente, não houve diferença significativa entre a quantidade de alimento consumido na metade Bandeja e na metade Espalhada por nenhum dos casais ($P = 0,8482$; $t = 0,1950$, Figura 13). Pode-se notar uma diferença no consumo do primeiro casal (M1/F1): eles pertenciam a uma instituição diferente dos demais (Zoológico de São Bernardo do Campo), onde a quantidade de alimento fornecida aos animais era maior. Entretanto, pode-se observar que, mesmo neste caso, o consumo nas duas metades do recinto era semelhante.

Figura 13 – Quantidade de alimento consumido em cada uma das metades do recinto (Bandeja e Espalhada) por cada um dos casais de lobos guarás (a) M1/F1, (b) M2/F2, (c) M3/F3, (d) M4/F4 durante o Teste de Escolha.

Entretanto, o tempo despendido na metade Espalhada foi significativamente maior que na metade Bandeja (Teste T-Pareado, $P = 0,0094$), Figura 14. Este resultado indica que os animais gastaram relativamente mais tempo buscando comida na metade em que ela não estava facilmente acessível enquanto ainda havia alimento disponível e visível nas bandejas, que poderia ser acessado com menor gasto energético. Ao efetuar a primeira escolha, os animais não permaneciam todo o tempo na metade escolhida. Como o acesso às duas metades do recinto era livre, sendo necessário somente contornar a tela que fazia a divisão, eles iam e vinham entre as metades diversas vezes. O número de vezes em que os animais trocavam de recinto variava grandemente entre as sessões, indo de 3 a 49 vezes, com uma média de 13,9 trocas por sessão.

Figura 14 - Tempo gasto em cada uma das metades do recinto (Bandeja e Espalhada) por cada um dos lobos guarás durante o Teste de Escolha.

DISCUSSÃO

De maneira resumida, e em função das hipóteses inicialmente colocadas, nossos resultados confirmam: (a) a expectativa de um aumento de forrageamento (mas não de exploração) em função do procedimento de enriquecimento; (c) a escolha do alimento disperso (enriquecimento) em relação ao alimento de fácil acesso; (d, e) a influência dos fatores de temperamento e de gênero sobre o comportamento e as reações hormonais, sendo que esta influência se manifestou de maneira complexa, através de uma interação de fatores. Os resultados apontam para a rejeição da hipótese de um decréscimo na frequência de comportamentos indicativos de disfunção (*pacing*) em todos os indivíduos (b), da hipótese de que indivíduos mais exploradores apresentariam preferência mais marcada que os cuidadosos pela alternativa de alimento disperso (f) e que teriam maior aumento de forrageamento.

Efeitos globais do enriquecimento

Foi observado aumento significativo na exibição de comportamentos ligados ao Forrageamento. Esse aumento pode ser explicado pelo fato de os estímulos empregados incentivarem esse tipo de comportamento: os animais eram levados a procurar pelo alimento ativamente e isso necessariamente levava a escores mais altos de Forrageamento. Contudo, o efeito de aumento de Forrageamento mostrou-se persistente além do período imediato em que o enriquecimento era disponibilizado: manifestou-se horas depois (resultado próximo da significância indicando aumento na frequência de Forrageamento também à tarde). Isso indica que o enriquecimento, sob a forma de itens alimentares espalhados, de forma a promover atividade, pode ter efeitos persistentes. Uma mudança comportamental que tenha efeito, ainda, várias horas depois de apresentado o estímulo tem um potencial mais efetivo para promover efeitos duradouros nos níveis de bem-estar dos animais. Nosso resultado tem um significado mais abrangente que aquele observado por Cummings et al. (2007), que trabalharam com a mesma espécie e utilizaram

técnicas semelhantes, pois estes só verificaram alterações imediatas no Forrageamento (nos minutos seguintes à disponibilização deste).

As reações hormonais ao enriquecimento não puderam ser generalizadas: considerando a amostra como um todo, não houve efeito significativo da aplicação do enriquecimento.

O Teste de Escolha trouxe resultados claros com relação à forma como os animais percebem o enriquecimento ambiental. Considerando que, na maioria das sessões, após 30 minutos de consumo, havia sobras de alimento em ambas as metades, é interessante que os animais tenham despendido tempo procurando por alimento no meio da vegetação enquanto ainda havia alimento disponível e visível nas bandejas. Como os animais frequentemente se locomoviam entre as metades do recinto, não é plausível afirmar que eles permanecessem procurando alimento na metade Espalhada por não saberem ainda haver alimento de fácil acesso na metade Bandeja. É essa uma indicação de preferência dos animais por uma forma de forrageamento que demanda esforço, em detrimento de uma forma que otimiza o ganho energético. Esse fato que, considerado isoladamente, parece contradizer as teorias de forrageamento ótimo (Stephens & Krebs, 1986), sugere que os animais podem ter outras prioridades além do simples consumo alimentar, com um gasto mínimo de energia. Segundo esse ponto de vista, os animais cativos irão sofrer com a falta de estímulos do cativeiro. O efeito observado é análogo ao efeito relatado como *contrafreeloading*, já observado em várias espécies (Jensen, 1963; Neuringer, 1969; Krebs et al., 1978; Inglis et al., 1997; Bean et al., 1999; Lindqvist & Jensen, 2008), e que, segundo Bean et al. (1999), pode ser motivado pela aquisição de informação sobre a localização de fontes de alimento durante o forrageamento exploratório, informações essas que poderiam ser úteis em futuras buscas.

Efeitos do temperamento sobre as concentrações de MGC

Embora tenhamos observado efeito generalizado do enriquecimento para toda a amostra (comportamental), registramos também a influência do temperamento, aqui avaliados através do Teste do Objeto Novo, sobre os resultados do enriquecimento.

Pode-se, aqui, falar em perfis de temperamento, uma vez que não houve diferença significativa entre as performances dos animais na primeira série de testes de Objeto Novo (sessões 1 a 3) e na segunda (sessões 4 a 6), realizada quatro meses depois, dado que indica características relativamente estáveis (Koolhaas et al., 1999). O resultado obtido através da comparação dos dados hormonais e dos dados provenientes do Teste de Objeto Novo corrobora a ideia de que o efeito do enriquecimento depende das características individuais em lobos guarás (Carlstead & Kleiman, 1998; Vasconcellos et al., 2009). Os lobos utilizados neste estudo, como é o caso de muitos animais em zoológicos e criadouros, tinham diferentes origens (alguns haviam nascido em cativeiro, enquanto outros nasceram em vida livre, Tabela 1). Eles diferiam, ainda, em suas idades e em suas experiências sociais, fatores que, como já relatado por McDougall et al. (2006), podem afetar de forma intensa os perfis comportamentais dos animais e, por conseguinte, sua forma de reagir a desafios ambientais e seu nível de bem-estar (Arnold, 1995; Carlstead, 1996; Crockett et al., 2000).

Considerando todos esses fatores, os resultados apontaram para as experiências sociais dos indivíduos como a variável mais influente (forma de criação). É possível que as trajetórias ontogenéticas dos lobos deste estudo tenham produzido diferenças em suas propensões e sensibilidade a desafios ambientais. Os quatro animais que haviam sido criados artificialmente foram os únicos indivíduos que apresentaram o perfil explorador (IC menor que 0,5), corroborando as colocações de McDougall et al. (2006), de que a criação artificial pode induzir ao desenvolvimento de traços de temperamento e respostas específicas, tais como a redução do medo e a tendência à exploração do ambiente.

Diferenças em temperamento e em traços individuais foram relatadas como fatores que influenciam a resposta ao estresse em várias espécies (Mülleider et al., 2003; De Palma et al., 2005; Kralj-Fiser et al., 2007; Slotta-Bachmayr & Schwarzenberger, 2007; Albert et al., 2008) e trabalhos avaliando temperamento e diferenças comportamentais, e ainda a influência dessas diferenças nas reações ao enriquecimento foram também realizados com várias espécies (Walsh & Cummins, 1976; Cooper & Mason, 2000; Harri et al., 2000; Mason et al., 2001; Raffa et al.,

2002; Bremner-Harrison et al., 2004; Kirkden & Pajor, 2006; Powell & Svoke, 2008). Embora a variabilidade interindividual em lobos guarás já houvesse sido observada por Carlstead e Kleiman (1998), Cummings et al. (2007) e Vasconcellos et al. (2009), essa é a primeira vez que um teste de temperamento foi aplicado para lobos guarás e relacionado posteriormente com respostas ao enriquecimento. Estas diferenças de reação aos desafios ambientais são potencialmente importantes para o planejamento de intervenções de enriquecimento.

Entretanto, o teste aplicado (teste de Objeto Novo) tem suas limitações: avalia padrões de reação à apresentação de um objeto novo, sem trazer informações a respeito de perfis de socialidade, propensão a estados de ansiedade, tensão, relaxamento etc. Um estudo futuro desejável, que viria acrescentar aos resultados obtidos, deveria ter uma abordagem multi-fatorial, em que os animais fossem submetidos a baterias de testes, usando análises multivariadas para extrair fatores a partir de múltiplos dados. Assim, se poderiam apurar os resultados, chegando a instrumentos de medida mais abrangentes.

Efeitos do temperamento sobre o comportamento

O temperamento dos animais também teve efeito na resposta comportamental ao enriquecimento: os animais mais cautelosos apresentaram aumento mais marcado na frequência de Forrageamento.

A interpretação desses dados a partir dos *coping styles* (Koolhaas et al., 1999) indicaria que os animais exploradores (proativos), por serem mais rígidos em suas rotinas, teriam percebido o enriquecimento como algo fugindo do controle ou da rotina, enquanto que os animais cautelosos (reativos), por serem mais flexíveis, teriam interagido por mais tempo com o enriquecimento, lidando com seu ambiente de forma mais positiva. Entretanto, não é plausível pensar que a situação de enriquecimento tenha representado, em alguma medida, efeito aversivo para os animais exploradores: estes foram os que interagiram de forma mais intensa com os objetos novos. A esse fato, soma-se o resultado do Teste de Escolha, em que todos os animais, indistintamente, “escolheram” despender mais tempo buscando alimento

no meio da vegetação (situação de enriquecimento ambiental) ao invés de se alimentarem nas bandejas.

Uma outra hipótese a ser levantada é de que a ocorrência de indivíduos que não apresentaram aumento significativo de Forrageamento tenha se dado em função do excesso de estímulos (Hutchinson, 2005) e, em função disso, estes teriam abandonado o forrageamento antes de ficarem saciados. Ao observarmos os indivíduos que estão nesse grupo (M2, F5, F6 e F4), entretanto, vemos que dois deles estão entre os indivíduos com menor Índice de Cautela, não sendo então plausível considerar que sua reação ao enriquecimento seja causada por medo ou aversão. Além disso, o resultado dos Testes de Escolha também falseiam esta hipótese.

É possível, ainda, que os indivíduos que apresentaram menor aumento na frequência de Forrageamento fossem forrageadores mais competentes, conseguindo assim o mesmo recurso com um menor esforço. Essa hipótese é plausível, uma vez que, no Teste de Escolha, o consumo de ambas as fontes (alimento de fácil acesso e alimento cujo acesso demanda esforço) não difere significativamente. Dessa forma, para estes indivíduos, já exploradores, talvez o enriquecimento não tenha representado um grande desafio, alterando minimamente sua busca alimentar,

Efeitos do gênero

Quando analisamos conjuntamente os dados de temperamento e de reação hormonal ao enriquecimento, observamos um efeito do gênero dos animais sobre esses resultados. Esse efeito, já indicado em estudo prévio (Vasconcellos et al. 2009), aponta para uma análise dos resultados de machos e de fêmeas separadamente.

As fêmeas mais cautelosas mostraram uma reação de redução hormonal face ao enriquecimento, enquanto que as mais exploradoras apresentaram resposta hormonal oposta. O fato de as cautelosas apresentarem um maior aumento na frequência de Forrageamento corrobora os resultados de outros estudos de enriquecimento (Carlstead et al., 1993a, 1993b; Wielebnowski et al., 2002a, 2002b).

Segundo a interpretação dada nesses trabalhos, o procedimento beneficiaria estes animais na medida em que diminuiria as respostas ao estresse (preparo para situações emergenciais), diminuindo assim os níveis estresse “negativo”. Concordamos que o enriquecimento ambiental provavelmente trouxe benefícios mais diretos a estes indivíduos, também considerando que o aumento deste tipo de comportamento normalmente é interpretado como indicativo de níveis adequados de bem-estar (desempenho de comportamentos típicos da espécie), além de ser essencial para a sobrevivência imediata dos indivíduos (Young, 2003). É possível que a redução nos MGC observada nesses indivíduos, assim como nos achados de De Boer et al. (1990) e Korte et al. (1992) tenha tido um efeito reforçador nas cautelosas, promovendo atividade e possibilitando o desempenho de um papel ativo, ao lidar com os desafios.

Essa interpretação torna-se ainda mais plausível quando observamos a tendência à correlação observada entre as concentrações de MGC e o Forrageamento, indicando concentrações menores relacionadas à maior exibição de comportamentos de Forrageamento. Esse achado está em linha com outros estudos em enriquecimento, que observaram uma redução nas concentrações de MGC concomitante com o aumento na apresentação de comportamentos típicos das espécies em estudo (Boinski et al., 1999b, Belz et al., 2003; Hansen et al., 2007, Moreira et al., 2007).

Entretanto, ao adotarmos tal interpretação na íntegra, essa abordagem levaria à conclusão de que os procedimentos teriam sido, em alguma medida, danosos para as fêmeas exploradoras (devido ao aumento de MGC e, por conseguinte, de estresse negativo). Mas, o conjunto de dados não indica que as exploradoras tenham sido prejudicadas pelos procedimentos: elas, assim como as exploradoras, dedicaram, no Teste de Escolha, mais tempo para forragear na metade em que o alimento estava disperso e, além disso, consumiram a mesma quantidade sob ambas as condições (alimento *ad lib* e de difícil acesso). Dessa forma, embora a apresentação do desafio tenha gerado um aumento nas concentrações de MGC, não se pode eliminar a hipótese de que uma ativação do eixo HPA tenha reduzido um possível tédio de cativeiro (Mench, 1998). Essa interpretação também é

corroborada por resultados de trabalhos de enriquecimento com outras espécies, em que um aumento nas concentrações de MGC indicava indivíduos mais exploradores e interativos com seu ambiente (Natelson et al., 1988; Haemisch et al., 1994; Beattie et al., 2000; Smith & Dobson, 2002; Marashi et al., 2003; Cummings et al., 2007), mostrando que este tema é ainda controverso.

Uma outra interpretação, ainda que *ad hoc*, poderia ser a de que existiria uma margem de aumento de metabólitos e de ativação que acompanhe um aumento de bem estar. O aumento dos metabólitos poderia estar acompanhando uma forma de contato com o ambiente que aumentasse a ativação do animal. Para esses indivíduos, já exploradores, é possível que uma atividade similar à de obtenção de uma presa seja um “bom” estressor, que estimule o eixo HPA (Moberg, 2000) e possa inclusive reduzir o efeito dos procedimentos de manejo sobre os traços de temperamento desses animais. Nossos achados corroboram as colocações de McDougall et al. (2006) quando estes afirmam que esse tipo de procedimento e as características do ambiente de cativeiro podem moldar o comportamento desses animais através da ausência de desafios, levando a respostas rígidas ao ambiente e a uma reação indicativa de ativação dos mecanismos de resposta ao estresse. Então, semelhantes procedimentos de enriquecimento ambiental potencialmente, ao longo do tempo, tenderiam a diminuir a influência dos procedimentos de manejo sobre as reações ao estresse nesses indivíduos (Haverbeke et al., 2007).

Esse tipo de efeito foi observado por Beerda et al. (1999) em cães submetidos inicialmente a um estresse moderado (um período de sete semanas em que eram mantidos em grupo ao ar livre, durante más condições climáticas). Quando, após esse período, eles eram submetidos a restrição espacial e isolamento social (por seis semanas), apresentavam pico de concentração de glicocorticóides inicial, seguido de uma redução significativa, que levava a concentrações abaixo do nível de linha de base após seis semanas. Com os cães que experimentaram boas condições climáticas durante o período inicial, as concentrações após seis semanas de restrição espacial ainda se encontravam significativamente mais altas que as concentrações de linha de base. Eles concluem que a qualidade das circunstâncias que precedem um período de exposição a um estressor determina a magnitude e até

mesmo a direção das respostas hormonais a esse estresse. Seguindo essas conclusões, é possível que animais frequentemente desafiados tendam a apresentar respostas ao estresse reduzidas.

O número menor de indivíduos do sexo masculino ($N = 3$) pode ter influído na ausência de correlação significativa entre a reação hormonal ao enriquecimento e os perfis de temperamento nos machos. Entretanto, observando os dados, notamos que a tendência destes é oposta à das fêmeas, ou seja, machos mais cuidadosos tenderam a um aumento nos MGC em resposta ao enriquecimento. De qualquer forma, são necessários estudos com um maior número de indivíduos para investigar essa questão.

Diferenças hormonais de gênero nas concentrações de MGC já foram relatadas para outras espécies. Wielebnowski et al. (2002a) observaram que fêmeas de pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*) em cativeiro apresentavam níveis mais elevados de concentrações de corticosteróides se comparados com os de machos, considerando valores basais, máximos e totais. Touma et al. (2003) demonstraram haver diferenças significativas nas rotas de excreção de metabólitos de glicocorticóides de roedores machos e de fêmeas. Em seus estudos, observaram que, embora a maior parte dos metabólitos de corticosterona tenha sido excretada através das fezes em ambos os sexos, a quantidade de radioatividade recuperada nas amostras de machos (aproximadamente 73%) era significativamente maior que nas de fêmeas (por volta de 53%), embora não se tivesse uma explicação clara para o fato. Belz et al. (2003) comparou os níveis de corticosterona e de ACTH de ratos de ambos os sexos em condições de linha de base e de submissão a um estresse moderado (contenção para aplicação de uma injeção com solução salina), considerando animais em ambientes enriquecidos e sem enriquecimento. Os níveis dos dois hormônios foram menores para ambos os sexos e em ambas as condições (linha de base e estresse moderado) nos animais alocados em ambientes enriquecidos. Entretanto, embora os níveis hormonais de machos e fêmeas não diferissem na linha de base, e não tenha havido diferenças nos níveis de corticosterona entre os sexos, os níveis de ACTH de machos foram significativamente maiores que os de fêmeas, quando submetidos à situação estressante.

Embora os trabalhos acima tenham relatado diferenças nas concentrações de MGC entre os sexos, o mecanismo dessas diferenças ainda não está claro, podendo ser atribuído a diferenças no metabolismo, quando o animal se encontra diante de desafios. No caso dos lobos guarás, a validação levada a termo (Apêndice A) mostra não haver diferenças nos MGC basais de machos e fêmeas. Dessa forma, se a diferença não está nos níveis basais, é possível que ela se apresente quando os indivíduos são expostos a desafios ambientais.

Esta informação é inédita e vem contribuir para o conhecimento da espécie, embora os processos motivacionais envolvidos nessas respostas ainda precisem ser explorados em estudos com um maior número de animais, de ambos os gêneros.

Juntando os achados

Ao juntarmos os achados do Experimento de Enriquecimento e dos testes, observamos várias indicações de que o enriquecimento, embora tenha promovido aumento nas concentrações de MGC em parte dos animais, não tenha sido danoso para quaisquer deles (redução nas concentrações de MGC nas fêmeas cautelosas, aumento na frequência do Forrageamento da amostra como um todo para todo o dia e a tendência ao aumento no período da tarde, redução de *Pacing* na F6, preferência pela busca do alimento em detrimento da alimentação *ad lib* etc.). Concordamos com as colocações de Moberg e Mench (2000), quando estes afirmam que, embora o estresse seja uma resposta biológica ativada quando um indivíduo encontra uma ameaça (percebida ou real) à sua homeostase, e que qualquer ameaça possa ser considerada um agente gerador de estresse, nem todos os agentes têm impacto negativo sobre a saúde do indivíduo, havendo um nível mínimo de estresse necessário para garantir a sobrevivência e permitir adaptações às mudanças ambientais. Acreditamos também haver um nível ótimo de ativação dos indivíduos a ser buscado, levando a uma melhora na qualidade de vida dos animais. É possível, então, que o uso das concentrações de glicocorticóides, por si só, não seja um bom indicador de níveis de bem-estar ou de estresse, e deva sempre ser associado a outros indicadores, para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos. Há indicações de que os dados hormonais, embora possam contribuir para

a compreensão de respostas comportamentais, não sejam estritamente relacionados a estas, uma vez que os hormônios e comportamento pertencem a domínios diferentes, com convergência parcial. Então, uma alteração comportamental pode não levar, necessariamente a uma alteração hormonal, especialmente se o evento eliciador dessa alteração não for um estressor agudo.

Um de nossos mais importantes achados foi a ocorrência de perfis comportamentais diferenciados e a correlação desses perfis com a resposta hormonal de fêmeas de lobos guarás a desafios ambientais, tais como o enriquecimento ambiental. Esses dados são especialmente relevantes, pois as condições de criação e as características do ambiente de cativeiro podem influenciar de forma intensa os traços de temperamento dos animais cativos, afetando os níveis de estresse e bem-estar, uma vez que diferentes indivíduos respondem ao estresse de cativeiro de forma diferente (Arnold, 1995; Carlstead, 1996; Crockett et al., 2000). A identificação de traços de temperamento que se correlacionem com níveis elevados de estresse durante os procedimentos de manejo pode levar à criação de procedimentos adaptados especialmente para reduzir o estresse em indivíduos particularmente suscetíveis, assim como para melhorar a qualidade de vida destes.

Nossos dados destacam o significado do enriquecimento ambiental para animais cativos e corroboram as colocações de Dawkins (1990) e Barnard (2007), que afirmam que os animais apresentam padrões comportamentais evolutivamente selecionados, cuja expressão se constitui uma necessidade, sendo que muitos animais aceitam inclusive “pagar um preço” pela exibição desses comportamentos, preço este que pode inclusive ser um gasto superior de energia e tempo para o forrageamento, como foi visto nos testes de escolha. Essa preferência observada pode, então, ser utilizada como uma medida da importância daquele comportamento para os animais (Cooper & Mason, 2000). Então, ao satisfazer essa necessidade, podemos considerar que as técnicas utilizadas promoveram uma melhora nos níveis de bem-estar dos lobos guarás por nós estudados.

CONCLUSÕES

Os nossos resultados indicam que a apresentação de desafios a animais como os lobos guarás, que são mantidos normalmente em ambientes de cativeiro sem novidade, e sem oportunidades de exercerem comportamentos típicos da espécie (pelo menos no caso do Forrageamento) produz aumentos de atividade dirigidas para o alimento, com uma tendência à persistência temporal. Esta atividade pode ser considerada positiva do ponto de vista do bem estar uma vez que os animais numa situação de escolha, dedicam relativamente mais tempo para alcançar itens alimentares dispersos e trabalhosos.

Os resultados do Teste de Escolha demonstram que os lobos guarás, ao se alimentarem, não escolhem exclusivamente uma fonte alimentar de baixo custo energético para obtenção, fato que indica uma preferência por uma forma de alimentação que simula a forma de busca de alimento em vida livre. Esses resultados corroboram o enriquecimento alimentar através do aumento na dificuldade de acesso como técnica valiosa para promoção de bons níveis de bem-estar em lobos guarás cativos.

Indicam também que os animais reagem de maneira diferente em aspectos de seu comportamento e de suas reações hormonais, quando expostos a este tipo de enriquecimento. A classificação dos animais em “exploradores” e “cautelosos” a partir de um teste do Objeto Novo, é preditiva de reações de aumento ou diminuição de metabólitos. O aumento de Forrageamento constatado nos períodos de enriquecimento foi significativo na amostra de animais cautelosos, mas não chegou a ser significativo nos animais exploradores.

No caso da reação hormonal, não houve diferença significativa entre animais cautelosos e exploradores, mas, se tomada a amostra de fêmeas, nota-se que as fêmeas cautelosas tiveram redução de metabólitos e as exploradoras aumento. Esta

é uma interação interessante (a ser investigada mais a fundo em estudos futuros) entre temperamento e gênero.

Os nossos resultados são originais e relevantes na medida em que apontam para a influência de variáveis de temperamento e de gênero em procedimentos de enriquecimento ambiental. Parece-nos que a área terá muito a ganhar se passar do esquema geral e indiferenciado de avaliação e de manejo para um esquema em se tente acessar características individuais dos animais, modulando a intervenção de enriquecimento em função delas.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Validação da técnica de radio-imuno ensaio para monitoramento não-invasivo de glicocorticóides em lobos guarás (*Chrysocyon brachyurus*)

A. Introdução

Embora técnicas não-invasivas de monitoramento de glicocorticóides tenham sido usadas extensivamente por pesquisadores e conservacionistas em várias espécies (Touma & Palme, 2005; Schwarzenberger, 2007), e sejam largamente aceitas como efetivas para monitorar os níveis de glicocorticóides, o uso dessas técnicas para avaliar de forma confiável a atividade adrenocortical de determinada espécie não é simples. Devido a diferenças existentes no metabolismo ou na excreção de MGC entre espécies e, algumas vezes, até mesmo entre os sexos dentro de uma mesma espécie (Palme et al., 2005), torna-se imperativa uma validação para cada espécie e sexo a ser estudado (Palme, 2005; Touma & Palme, 2005).

B. Métodos

Os procedimentos deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, sob o protocolo nº. 001.2009.

B.1. Animais

Foram feitas coletas de amostras fecais de dois lobos guarás adultos, nascidos e mantidos em cativeiro. Os animais tinham acompanhamento veterinário periódico, sem histórico de problemas metabólicos. Em função de resultados prévios, que sugeriram que fêmeas e machos da espécie em questão pudessem ter metabolismos diferentes com relação a hormônios de estresse, o estudo foi com um casal. Os lobos estavam alocados juntos, no Zoológico de São Bernardo do Campo,

em um recinto medindo 490 m², com grama, árvores e duas casas para cachorros. Os animais foram alimentados uma vez ao dia, de manhã, uma refeição que consistia de frutas sazonais (maçã, banana mamão) e carne (coração bovino, ração úmida para cães e ratos de biotério abatidos). Ambos tinham acesso a água à vontade.

B.2. Coleta fecal

Amostras fecais frescas foram coletadas diariamente, entre 9:00 e 10:00 horas, por 12 dias (seis antes da injeção de ACTH e seis dias após esse procedimento). No período da tarde, um pedaço de carne com corante artificial para fins alimentícios (Mix Coralim) era fornecido às fêmeas, para permitir a identificação das amostras fecais a serem coletadas no dia seguinte. Cada amostra coletada foi imediatamente homogeneizada (macerada com as mãos dentro de um saco plástico) e congelada (-20°C) até a extração.

B.3. Extração de Metabólitos de Glicocorticóides Fecais

A extração de MGC foi feita de acordo com o método de Brown et al. (1994), como já descrito para lobos guarás (Cummings et al., 2007), com algumas modificações. Cada amostra foi centrifugada a 500 x g por 15 minutos, o sobrenadante foi recuperado e o pellet ressuspensionado em 5 mL de 90% etanol e re-centrifugado a 500 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi recuperado e adicionado ao sobrenadante anterior, seco e ressuspensionado em 1 mL metanol (100%). Os extratos foram armazenados a -20° C até a análise.

B.4. Ensaio Hormonal

Metabólitos de glicocorticóides foram quantificados usando um *kit* de duplo anti-corpo para dosagem de corticosterona por Radio-Imuno Ensaio (RIE), disponível comercialmente (MP Biomedicals, Irvine, CA), seguindo o protocolo do fabricante. Esse ensaio se mostrou eficaz para detectar mudanças na atividade adrenocortical em várias espécies (Wasser et al., 2000). Embora o cortisol tenha se mostrado um glicocorticóide adequado para ser usado como parâmetro para monitoramento de

alterações na atividade adrenocortical (Schatz & Palme, 2001), optou-se pela utilização de um *kit* para dosagem de corticosterona por ser este *kit* menos específico que o de cortisol, ligando-se, portanto com uma maior quantidade de metabólitos; por conseguinte mais adequado para a dosagem de glicocorticóides em uma espécie para a qual técnica de mensuração ainda não havia sido validada. As reações cruzadas do *kit* utilizado encontram-se na Tabela 9. Antes das análises, os extratos fecais foram diluídos em RIE diluente (1:100 e 1:20, quando necessário). As concentrações de MGC fecais foram expressas em microgramas por grama de fezes úmidas.

Tabela 9 – Percentual de reações cruzadas com esteróides do *kit* de duplo anti-corpo para dosagem de corticosterona por Radio-Imuno Ensaio (RIE) MP Biomedicals, Irvine, CA.

Esteróides	Percentual de reação cruzada
Corticosterona	100,00
Desoxicorticosterona	0,34
Testosterona	0,10
Cortisol	0,05
Aldosterona	0,03
Progesterona	0,02
Androstenediona	0,01
5 α -Dihidrotestosterona	0,01
Colesterol	< 0,01
Dehidroepiandrosterona	< 0,01
Dehidroepiandrosterona-sulfato	< 0,01
11-Desoxicortisol	< 0,01
Dexametasona	< 0,01
20 α -Dihidroprogesterona	< 0,01
Estrona	< 0,01
Estradiol-17 α	< 0,01
Estradiol-17 β	< 0,01
Estriol	< 0,01
Pregnenolona	< 0,01
17 α -Hidroxipregnenolona	< 0,01
17 α -Hidroxiprogesterona	< 0,01

Para estabelecer a validade bioquímica do ensaio, foi feito um teste de paralelismo: amostras misturadas foram diluídas em série com o diluente do *kit* para comparar a curva de ligação do anticorpo com aquela padrão fornecida pelo *kit*.

B.5. Teste Desafio de ACTH

Esta validação, largamente utilizada em estudos hormonais, envolveu o monitoramento de MGC fecais antes e depois da administração exógena de ACTH (Hormônio Adrenocorticotrófico), para demonstrar a relação temporal entre mudança na atividade adrenal e na concentração de MGC nas fezes.

Foi administrada uma injeção intra-muscular de 0,38 mg de ACTH sintético (Synacthen 1 mg/ml; Novartis Farma S.p.A, Origgio, VA) a cada animal. O dia da injeção de ACTH é referido como do Dia 0, com as coletas de amostras fecais começando no dia -5 e continuando até o dia 6.

B.6. Estatística

O Coeficiente de Correlação de Pearson foi usado para avaliar a correlação entre as concentrações de MGC da fêmea e do macho. Uma regressão linear foi usada para verificar o paralelismo entre a curva padrão do kit e a curva da diluição dos extratos fecais. Foi utilizado o Teste T Bicaudal para comparar as concentrações médias de MGC de machos e fêmeas durante a Linha de Base.

Para cada animal, foi calculada a concentração média de MGC para todo o período antes da aplicação do ACTH. Aumentos na excreção de MGC após a injeção de ACTH foram considerados significantes quando excederam a concentração média da Linha de Base mais dois desvios-padrão (Cummings et al., 2007).

C. Resultados e Discussão

C.1. Validação bioquímica do ensaio

Diluições seriais de um pool de extratos fecais produziram curvas paralelas à curva padrão de corticosterona, determinada pelo fabricante dos kits de dosagem de corticóides fecais: $r=0,998$ ($y = 2,485+0,896x$), $P < 0,0001$. A sensibilidade do Radio-Imuno Ensaio foi de 0,22 µg/g. O coeficiente de variação intra-ensaio baixo foi de 2,49% e intra-ensaio alto, 6,65%.

C.2. Concentrações de Metabólitos de Glicocorticóides Fecais

Os animais mantiveram uma concentração média de $8,65 \pm 2,89 \mu\text{g/g}$ de fezes (fêmea) e $6,99 \pm 3,23 \mu\text{g/g}$ de fezes (macho) por todo o período de linha de base, sem diferença significativa entre esses valores (Teste T, $t = 0,855$, $P = 0,417$, Figura 15). A aplicação do ACTH resultou em um aumento (500-600%) nas concentrações de MGC do Dia 0 para o Dia 1 ($60,29 \mu\text{g/g}$ de fezes para a fêmea e $41,59 \mu\text{g/g}$ de fezes para o macho) e em uma redução do Dia 1 para o Dia 2 e do Dia 2 para o Dia 3, quando a concentração retornou para os níveis da linha de base. As análises estatísticas evidenciaram a correlação altamente significativa entre os dados do macho e da fêmea ($r = 0,94$; $P < 0,0001$). Ambos os animais tiveram concentrações relativamente altas no Dia -2 por razões desconhecidas. Entretanto, as concentrações de MGC nesse dia não excederam o limite pré-determinado de significância (média da linha de base mais dois desvios-padrão). Por essa razão, o Dia -2 foi excluído da análise.

Figura 15 - Concentrações de metabólitos de glicocorticóides fecais de uma fêmea (a) e de um macho (b) de lobos guarás, dosados por Radio-Imuno Ensaio antes e após aplicação de ACTH (Dia 0).

Nossos resultados demonstraram claramente que, em lobos guarás, a atividade adrenocortical é bem representada nas concentrações de MGC. Em ambos os animais, observamos um valor de pico no primeiro dia subsequente à aplicação de ACTH, que atingiu aproximadamente 500% e 600% dos valores de linha de base no macho e na fêmea, respectivamente. As concentrações de MGC retornaram para os níveis de linha de base três dias após a injeção. Esses resultados são consistentes

com os achados de Schatz e Palme (2001). Esses autores, usando Enzima-Imuno Ensaio em fezes de cães domésticos, mediram um aumento nas concentrações de metabólitos de cortisol de aproximadamente 700% após 22h da aplicação do ACTH. Dessa forma, tanto o tempo de latência para o pico nas concentrações como o percentual de aumento foram similares nas duas espécies, o que sugere um padrão de excreção semelhante entre lobos guarás e cães domésticos.

Como lobos guarás são uma espécie ameaçada, não foi possível trabalhar com uma amostra maior e, por conseguinte, ter um grupo controle. Como variações entre indivíduos nas concentrações de MGC foram relatadas em estudos semelhantes (Schatz & Palme, 2001; Chelini et al., 2006; Cummings et al., 2007), incluímos um período de linha de base de cinco dias. Dessa forma, cada animal serviria como seu próprio controle (Touma & Palme, 2005). Pelo mesmo motivo, não foi possível avaliar o efeito da contenção e da aplicação da injeção, através da aplicação de injeção com solução salina em outros indivíduos. Dessa forma, não podemos afirmar que o aumento nas concentrações de MGC no dia 1 não resulta dos efeitos estressantes do procedimentos de aplicação da injeção em si mesmo ao invés ou em adição à estimulação pelo ACTH. Entretanto, ambas as situações atendem aos nossos propósitos, através da elevação das concentrações circulantes de glicocorticóides. Da mesma forma, a relativamente alta concentração de MGC medida nas amostras do dia -2 de ambos os animais provavelmente refletiu um aumento nos níveis de glicocorticóides sanguíneos no dia anterior. Como os animais estavam no mesmo recinto, é provável que qualquer evento estressante que afetasse um dos animais no dia -3 afetasse também o outro e resultasse em um aumento nas concentrações de glicocorticóides sanguíneas que seriam refletidas nas concentrações fecais de MGC no dia seguinte, como observado. Como não tivemos condições de observar os animais continuamente durante este período, não pudemos identificar o evento.

A alta correlação entre os dados do macho e da fêmea e suas concentrações basais semelhantes sugerem que não haja diferença entre os sexos na rota de excreção dessa espécie. Entretanto, como diferenças entre sexos foram relatadas para várias espécies, tais como para cervídeos (Huber et al., 2003), porcos da Índia (Bauer et

al., 2008) ou lobos europeus (Sands & Creel, 2004), estudos mais aprofundados sobre a liberação de hormônios frente a desafios e o metabolismo dessas substâncias poderiam trazer luz à questão das diferenças entre os sexos em lobos guarás, uma vez que a razão das diferenças não está na rota de excreção do hormônio.

APÊNDICE B

Tabela 10 - Resultados da ANOVA de Medidas Repetidas / Friedman sobre as concentrações individuais de MGC dos lobos guarás, ao longo das quatro condições experimentais. À ANOVA / Friedman seguiu-se pós-teste Tukey/Dunn.

Indivíduos	Fases				<i>P / F</i> Fase alterada
	I	II	III	IV	
M1	13,97	10,44	9,68	16,1	$P=0,2267/F=1,747$
F1	14,83	13,06	8,02	5,6	$P=0,0355/F=3,211$
					I IV
M2	27,13	36,92	71,78	16,41	$P=0,0004/F=8,019$
					I x III; II x III; III x IV
F2	71,95	60,94	113,53	105,65	$P=0,2118/F=1,584$
F3	46,07	40,3	22,14	19,64	$P=0,0035/F=5,514$
					I x III; I x IV
M4	30,95	21,85	29,73	18,53	$P=0,4137/F=0,9808$
F4	24,88	66,94	36,35	43,32	$P=0,1196/F=2,096$
F5	40,17	54,63	38,97	27,2	$P=0,47 / F=0,85$
F6	17,4	44,06	11,11	18,84	$P=0,0008/F=7,17$
					I x II; II x III; II x IV
F7	30,12	24,56	18,37	9,39	$P=0,01398/F=1,956$

APÊNDICE C

Tabela 11 - Resultados significativos da ANOVA-I Fator sobre as concentrações de MGC de cada um dos lobos guarás, durante todo o período experimental. À Anova-I Fator seguiu-se pós-teste Bonferroni, comparando os indivíduos entre si.

Indivíduo	Comparação	<i>P</i>
M1	M2	0,019
	F2	<0,0001
	F4	0,001
	F5	0,006
F1	M3	0,006
	F2	<0,0001
	F4	<0,0001
	F5	0,002
M2	M1	0,019
	F1	0,006
	F2	<0,0001
F2	M1	<0,0001
	F1	<0,0001
	M2	<0,0001
	F2	<0,0001
	F3	<0,0001
	M4	<0,0001
	F4	<0,0001
	F5	<0,0001
	F6	<0,0001
	F7	<0,0001
F3	F2	<0,0001
M4	F2	<0,0001
F4	M1	0,001

	F1	<0,0001
	F2	<0,0001
F5	M1	0,006
	F1	0,002
	F2	<0,0001
F6	F2	<0,0001
F7	F2	<0,0001

APÊNDICE D

Tabela 12 – Distância mínima (em número de corpos) a que os indivíduos (Lobos guarás) chegaram dos objetos disponibilizados durante cada uma das seis sessões do teste de Objeto Novo (Sessão I – Balão colorido; Sessão II – Saco de rafia; Sessão III – Pessoa desconhecida; Sessão IV – Bola; Sessão V – Pilha de pneus; Sessão VI - Pessoa desconhecida).

Indivíduos	Sessões					
	I	II	III	IV	V	VI
M1	1	0	5	0	4	6
F1	1	0	10	0	0	10
M2	10	10	10	10	0	10
F2	0	0		0	0	
M3	0	10	10	10	0	7
F3	0	10	10	10	0	2,5
M4	0	0	0	0	0	0
F4	0	0	0	0	0	0
F5	2	0,25	4	0	0	3
F6	0	0		0	1,5	
F7		3	4	4	0	
Distância Média	1,3	3,02	5,89	3,09	0,55	4,81

APÊNDICE E

Tabela 13 - Resultados da ANOVA / Friedman de Medidas Repetidas sobre as médias das categorias comportamentais dos lobos guarás, ao longo das quatro condições experimentais (fases I a IV, observações ao longo de todo o dia). À ANOVA seguiu-se o pós-teste Tukey / Dunn.

Categoria	<i>P</i>	<i>F</i>	Fase alterada	Alteração
Comp. agon.	0,1571	1,878		
Forrageam.	<0,0001	13,388	II e IV	Aumento
Explor.	0,1484	1,931		
Locom.	0,2499	1,451		
Outros	0,9859	0,04765		
Brincad.	0,3782			
Descanso	0,9235	0,1581		
Não visível	0,2415	1,483		
<i>Pacing</i>	0,1620	1,850		
Comp. Social	0,3987	1,021		
Parado	0,0978	2,320		

*Nível de significância= $P \leq 0,0045$.

Tabela 14 - Resultados da ANOVA / Friedman de Medidas Repetidas sobre as médias das categorias comportamentais dos lobos guarás, ao longo das quatro condições experimentais (fases I a IV, observações matinais). À ANOVA seguiu-se o pós-teste Tukey / Dunn.

Categoria	<i>P</i>	<i>F</i>	Fase alterada	Alteração
Comp. agon.	0,1370	2,005	IV	Aumento
Forrageam.	0,0006	7,843		
Explor.	0,035	3,309		
Locom.	0,9573	0,1036		
Outros	0,8884	0,2102		
Brincad.	0,5193	0,7729		
Descanso	0,3842	1,056		
Não visível	0,2790	1,350		
<i>Pacing</i>	0,8169	0,3114		
Comp. Social	0,6895	0,4940		
Parado	0,6522	0,5505		

*Nível de significância= $P \leq 0,0045$.

Tabela 15 - Resultados da ANOVA / Friedman de Medidas Repetidas sobre as médias das categorias comportamentais dos lobos guarás, ao longo das quatro condições experimentais (fases I a IV, observações vespertinas). À ANOVA seguiu-se o pós-teste Tukey / Dunn.

Categoria	<i>P</i>	<i>F</i>	Fase alterada	Alteração
Comp. agon.	0,1332	2,031		
Forrageam.	0,0145	4,206		
Explor.	0,0094	4,664		
Locom.	0,0511	2,939		
Outros	0,7357	0,4263		
Brincad.	0,4142	0,9858		
Descanso	0,8391	0,2803		
Não visível	0,0508	2,946		
<i>Pacing</i>	0,1041	2,261		
Comp. Social	0,2669	1,391		
Parado	0,099	2,308		

*Nível de significância= $P \leq 0,0045$.

APÊNDICE F

Tabela 16 – Frequências relativas médias das categorias comportamentais dos lobos guarás registradas durante a fase I do Experimento de Enriquecimento Ambiental durante o período matutino.

Categorias comportamentais	<i>Indivíduos</i>									
	M1	F1	M2	F2	M3	M4	F4	F5	F6	F7
Comp. agon.	0,63	0,83	0,83	0,00	0,00	0,21	0,00	0,42	1,25	0,00
Forrageam.	12,08	23,96	23,96	3,33	2,50	2,50	5,63	16,25	18,96	7,08
Explor.	0,21	0,00	0,00	0,83	2,71	2,29	4,17	0,63	0,83	0,42
Locom.	22,92	17,92	17,92	24,17	34,38	13,96	14,79	6,88	28,54	12,71
Outros	0,21	1,04	1,04	0,83	1,67	7,29	15,42	0,63	3,13	0,21
Brincad.	0,00	0,00	0,00	0,21	0,21	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00
Descanso	0,00	0,00	0,00	6,04	8,75	35,42	13,13	45,83	24,58	45,63
Não visível	0,00	10,21	10,21	52,92	38,33	2,08	6,67	0,00	16,88	18,33
<i>Pacing</i>	59,17	41,46	41,46	6,67	1,67	29,38	35,42	19,79	2,08	0,00
Comp. Social	0,63	0,42	0,42	0,21	0,83	0,21	0,21	0,00	0,21	0,00
Parado	4,17	4,17	4,17	4,79	8,96	6,67	4,38	9,58	3,54	15,63

Tabela 17 – Frequências relativas médias das categorias comportamentais dos lobos guarás registradas durante a fase II do Experimento de Enriquecimento Ambiental durante o período matutino.

Categorias comportamentais	<i>Indivíduos</i>									
	M1	F1	M2	F2	M3	M4	F4	F5	F6	F7
Comp. agon.	0,21	0,42	0,00	0,42	0,21	0,63	0,21	0,00	0,63	0,21
Forrageam.	17,92	24,79	6,46	10,63	11,25	7,92	5,83	9,17	11,46	6,67
Explor.	1,67	0,42	0,00	0,21	2,92	2,08	2,29	0,63	1,67	0,83
Locom.	25,00	23,96	12,50	14,79	36,04	20,21	12,50	11,04	19,79	11,04
Outros	0,63	0,00	1,67	6,67	1,67	2,29	1,67	0,21	5,00	3,33
Brincad.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00
Descanso	0,00	0,00	0,00	5,21	2,29	13,13	2,92	26,46	20,21	48,75
Não visível	12,92	8,75	76,46	54,58	27,08	6,88	55,00	0,42	36,67	16,88
Pacing	36,46	31,04	0,00	2,29	8,13	39,58	13,54	36,46	0,42	1,67
Comp. Social	0,00	0,42	0,00	0,00	0,00	1,25	0,21	0,00	0,42	0,00
Parado	3,13	10,21	2,92	5,21	10,42	6,04	5,63	15,63	3,75	10,63

Tabela 18 – Frequências relativas médias das categorias comportamentais dos lobos guarás registradas durante a fase III do Experimento de Enriquecimento Ambiental durante o período matutino.

Categorias comportamentais	<i>Indivíduos</i>									
	M1	F1	M2	F2	M3	M4	F4	F5	F6	F7
Comp. agon.	1,46	0,00	0,00	0,00	0,00	0,42	0,42	0,63	0,83	0,21
Forrageam.	11,88	18,96	3,96	1,88	5,63	5,00	5,21	11,67	21,46	6,04
Explor.	0,00	0,21	0,21	1,04	1,67	3,54	1,46	0,21	0,42	0,21
Locom.	20,42	27,08	11,46	10,21	32,29	19,79	18,13	9,38	19,58	11,67
Outros	0,63	0,83	2,71	9,79	4,79	7,29	5,42	0,00	0,42	0,21
Brincad.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,42	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00
Descanso	0,00	0,42	7,71	12,29	32,08	25,42	1,04	15,63	0,00	66,88
Não visível	14,79	9,79	65,83	56,25	8,33	8,33	30,21	0,00	53,75	8,33
<i>Pacing</i>	48,54	35,00	1,46	0,63	9,58	19,38	29,79	44,17	1,67	0,42
Comp. Social	0,21	0,21	0,00	0,00	0,42	1,88	0,63	0,00	0,00	0,00
Parado	2,08	7,50	6,67	7,92	4,79	8,75	7,71	18,33	1,88	6,04

Tabela 19 – Frequências relativas médias das categorias comportamentais dos lobos guarás registradas durante a fase IV do Experimento de Enriquecimento Ambiental durante o período matutino.

Categorias comportamentais	<i>Indivíduos</i>									
	M1	F1	M2	F2	M3	M4	F4	F5	F6	F7
Comp. agon.	0,21	0,00	0,00	0,21	0,42	0,42	0,42	2,22	3,33	1,04
Forrageam.	21,67	36,88	11,25	15,53	10,63	7,71	9,34	14,44	26,04	6,25
Explor.	0,63	0,21	1,46	3,62	9,38	3,13	4,25	0,28	1,46	0,63
Locom.	22,08	27,29	18,54	10,43	32,71	11,46	21,02	15,56	18,33	11,04
Outros	0,00	0,42	3,13	2,55	2,71	13,33	5,94	0,00	2,50	1,67
Brincad.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00
Descanso	0,42	0,00	4,38	15,11	15,42	14,79	3,61	8,06	7,50	54,17
Não visível	6,25	0,21	46,88	45,53	19,17	11,67	17,62	0,00	38,13	18,75
<i>Pacing</i>	43,33	27,08	1,25	0,00	0,00	29,79	31,63	41,39	0,42	1,25
Comp. Social	0,21	0,42	0,00	0,00	0,21	0,83	0,21	0,00	0,00	0,00
Parado	5,21	7,50	13,13	7,02	9,38	6,88	5,73	18,06	2,29	5,21

APÊNDICE G

Tabela 20 – Frequências relativas médias das categorias comportamentais dos lobos guarás (registradas durante a fase I do Experimento de Enriquecimento Ambiental durante o período vespertino).

Categorias comportamentais	<i>Indivíduos</i>									
	M1	F1	M2	F2	M3	M4	F4	F5	F6	F7
Comp. agon.	0,21	0,00	0,00	0,42	0,00	0,42	0,00	0,00	1,30	0,22
Forrageam.	0,63	1,67	0,42	0,21	1,25	2,08	1,25	2,39	1,09	2,39
Explor.	0,42	0,00	0,00	0,83	2,08	4,58	3,75	0,87	2,17	0,87
Locom.	19,79	11,04	5,21	23,96	45,00	18,13	13,54	8,04	10,87	5,00
Outros	0,83	0,83	0,21	1,04	7,29	13,54	7,29	1,74	7,83	1,30
Brincad.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	2,50	0,42	0,00	0,00	0,00
Descanso	31,25	10,83	0,00	0,00	18,33	35,83	41,46	37,83	27,17	29,57
Não visível	0,00	43,54	93,54	46,04	12,50	0,42	6,25	1,96	45,00	56,52
<i>Pacing</i>	35,83	20,63	0,00	21,67	1,04	12,08	18,13	36,96	2,39	0,00
Comp. Social	0,42	0,00	0,00	1,04	0,42	0,42	0,21	0,00	0,00	0,00
Parado	10,63	11,46	0,63	4,79	11,88	10,00	7,71	10,22	2,17	4,13

Tabela 21 – Frequências relativas médias das categorias comportamentais dos lobos guarás (registradas durante a fase II do Experimento de Enriquecimento Ambiental durante o período vespertino).

Categorias comportamentais	<i>Indivíduos</i>									
	M1	F1	M2	F2	M3	M4	F4	F5	F6	F7
Comp. agon.	0,21	0,21	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,21	0,00
Forrageam.	1,67	3,96	0,83	0,42	1,46	4,79	5,00	6,04	11,25	6,04
Explor.	0,21	0,00	0,00	0,21	0,63	2,29	3,13	1,88	0,42	0,21
Locom.	16,04	5,83	6,88	13,75	21,25	16,88	10,83	5,00	9,17	4,17
Outros	0,21	0,21	0,63	9,79	10,21	10,21	6,46	2,29	4,58	3,33
Brincad.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,83	0,00	0,00	0,00
Descanso	7,92	0,42	0,21	31,67	45,42	24,38	32,71	59,38	20,42	30,83
Não visível	25,42	65,83	90,42	25,21	2,29	0,00	17,71	1,46	48,75	52,08
<i>Pacing</i>	45,00	17,08	0,00	10,00	1,46	24,79	15,00	11,67	1,46	0,00
Comp. Social	0,21	0,21	0,00	0,42	0,21	0,42	0,42	0,00	0,00	0,00
Parado	3,13	6,25	1,04	8,54	17,08	15,83	7,92	12,29	3,75	3,33

Tabela 22 – Frequências relativas médias das categorias comportamentais dos lobos guarás registradas durante a fase III do Experimento de Enriquecimento Ambiental durante o período vespertino.

Categorias comportamentais	<i>Indivíduos</i>									
	M1	F1	M2	F2	M3	M4	F4	F5	F6	F7
Comp. agon.	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21
Forrageam.	3,54	3,13	0,00	0,63	1,46	0,83	0,00	1,88	0,21	0,63
Explor.	0,63	0,21	0,00	0,83	1,04	1,67	2,29	0,42	0,00	0,42
Locom.	12,50	10,63	2,08	15,63	29,79	21,67	10,21	4,38	0,63	1,46
Outros	1,67	0,83	0,00	0,83	3,33	15,63	10,83	1,25	0,21	1,25
Brincad.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,00
Descanso	21,88	0,21	0,00	10,00	34,38	23,13	29,38	77,92	0,00	21,67
Não visível	41,25	62,50	96,88	52,92	6,25	11,46	16,67	2,71	95,21	73,13
<i>Pacing</i>	11,04	15,00	0,00	1,46	6,25	7,71	17,08	6,46	3,75	0,00
Comp. Social	0,42	0,00	0,21	0,21	0,21	0,42	0,21	0,00	0,00	0,00
Parado	7,08	7,29	0,83	17,50	17,29	17,50	13,13	5,00	0,00	1,25

Tabela 23 – Frequências relativas médias das categorias comportamentais dos lobos guarás registradas durante a fase IV do Experimento de Enriquecimento Ambiental durante o período vespertino.

Categorias comportamentais	<i>Indivíduos</i>									
	M1	F1	M2	F2	M3	M4	F4	F5	F6	F7
Comp. agon.	0,00	0,00	0,00	0,42	0,00	0,21	0,00	0,00	0,23	0,23
Forrageam.	1,46	6,67	0,42	0,21	3,54	0,63	1,46	8,33	2,73	0,00
Explor.	0,00	0,21	0,00	0,00	1,46	0,83	1,67	1,11	0,23	0,00
Locom.	20,42	20,63	2,08	13,96	22,71	9,17	10,83	7,50	4,09	0,00
Outros	1,25	1,04	0,63	3,13	4,58	15,42	12,08	2,22	1,82	0,45
Brincad.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,63	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Descanso	30,21	15,63	0,00	10,63	32,92	30,21	51,04	49,17	16,36	20,00
Não visível	29,58	15,00	93,75	48,96	7,92	17,50	7,29	0,56	72,50	79,09
<i>Pacing</i>	5,42	25,63	0,00	0,00	6,88	7,08	2,50	23,61	0,00	0,00
Comp. Social	0,00	0,21	0,00	0,00	0,21	0,00	0,21	0,00	0,23	0,00
Parado	11,67	15,00	3,13	22,71	19,17	18,96	12,92	7,50	1,82	0,23

APÊNDICE H

Tabela 24 – Frequências relativas médias das categorias comportamentais dos lobos guarás registradas durante a fase I do Experimento de Enriquecimento Ambiental durante todo o dia.

Categorias comportamentais	<i>Indivíduos</i>									
	M1	F1	M2	F2	M3	M4	F4	F5	F6	F7
Comp. agon.	0,42	0,42	0,42	0,21	0,00	0,31	0,00	0,21	1,28	0,11
Forrageam.	6,35	12,81	12,19	1,77	1,88	2,29	3,44	9,32	10,02	4,74
Explor.	0,31	0,00	0,00	0,83	2,40	3,44	3,96	0,75	1,50	0,64
Locom.	21,35	14,48	11,56	24,06	39,69	16,04	14,17	7,46	19,71	8,85
Outros	0,52	0,94	0,63	0,94	4,48	10,42	11,35	1,18	5,48	0,76
Brincad.	0,00	0,00	0,00	0,10	0,21	1,25	0,31	0,00	0,00	0,00
Descanso	15,63	5,42	0,00	3,02	13,54	35,63	27,29	41,83	25,88	37,60
Não visível	0,00	26,88	51,88	49,48	25,42	1,25	6,46	0,98	30,94	37,43
<i>Pacing</i>	47,50	31,04	20,73	14,17	1,35	20,73	26,77	28,37	2,24	0,00
Comp. Social	0,52	0,21	0,21	0,63	0,63	0,31	0,21	0,00	0,10	0,00
Parado	7,40	7,81	2,40	4,79	10,42	8,33	6,04	9,90	2,86	9,88

Tabela 25 – Frequências relativas médias das categorias comportamentais dos lobos guarás registradas durante a fase II do Experimento de Enriquecimento Ambiental durante todo o dia.

Categorias comportamentais	<i>Indivíduos</i>									
	M1	F1	M2	F2	M3	M4	F4	F5	F6	F7
Comp. agon.	0,21	0,31	0,00	0,21	0,10	0,42	0,10	0,00	0,42	0,10
Forrageam.	9,79	14,38	3,65	5,52	6,35	6,35	5,42	7,60	11,35	6,35
Explor.	0,94	0,21	0,00	0,21	1,77	2,19	2,71	1,25	1,04	0,52
Locom.	20,52	14,90	9,69	14,27	28,65	18,54	11,67	8,02	14,48	7,60
Outros	0,42	0,10	1,15	8,23	5,94	6,25	4,06	1,25	4,79	3,33
Brincad.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10	0,52	0,00	0,00	0,00
Descanso	3,96	0,21	0,10	18,44	23,85	18,75	17,81	42,92	20,31	39,79
Não visível	19,17	37,29	83,44	39,90	14,69	3,44	36,35	0,94	42,71	34,48
<i>Pacing</i>	40,73	24,06	0,00	6,15	4,79	32,19	14,27	24,06	0,94	0,83
Comp. Social	0,10	0,31	0,00	0,21	0,10	0,83	0,31	0,00	0,21	0,00
Parado	3,13	8,23	1,98	6,88	13,75	10,94	6,77	13,96	3,75	6,98

Tabela 26 – Frequências relativas médias das categorias comportamentais dos lobos guarás registradas durante a fase III do Experimento de Enriquecimento Ambiental durante todo o dia.

Categorias comportamentais	<i>Indivíduos</i>									
	M1	F1	M2	F2	M3	M4	F4	F5	F6	F7
Comp. agon.	0,73	0,10	0,00	0,00	0,00	0,21	0,21	0,31	0,42	0,21
Forrageam.	7,71	11,04	1,98	1,25	3,54	2,92	2,60	6,77	10,83	3,33
Explor.	0,31	0,21	0,10	0,94	1,35	2,60	1,88	0,31	0,21	0,31
Locom.	16,46	18,85	6,77	12,92	31,04	20,73	14,17	6,88	10,10	6,56
Outros	1,15	0,83	1,35	5,31	4,06	11,46	8,13	0,63	0,31	0,73
Brincad.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,21	0,10	0,10	0,00	0,00	0,00
Descanso	10,94	0,31	3,85	11,15	33,23	24,27	15,21	46,77	0,00	44,27
Não visível	28,02	36,15	81,35	54,58	7,29	9,90	23,44	1,35	74,48	40,73
<i>Pacing</i>	29,79	25,00	0,73	1,04	7,92	13,54	23,44	25,31	2,71	0,21
Comp. Social	0,31	0,10	0,10	0,10	0,31	1,15	0,42	0,00	0,00	0,00
Parado	4,58	7,40	3,75	12,71	11,04	13,13	10,42	11,67	0,94	3,65

Tabela 27 – Frequências relativas médias das categorias comportamentais dos lobos guarás registradas durante a fase IV do Experimento de Enriquecimento Ambiental durante todo o dia.

Categorias comportamentais	<i>Indivíduos</i>									
	M1	F1	M2	F2	M3	M4	F4	F5	F6	F7
Comp. agon.	0,10	0,00	0,00	0,31	0,21	0,31	0,21	1,11	1,78	0,63
Forrageam.	11,56	21,77	5,83	7,87	7,08	4,17	5,40	11,39	14,38	3,13
Explor.	0,31	0,21	0,73	1,81	5,42	1,98	2,96	0,69	0,84	0,31
Locom.	21,25	23,96	10,31	12,19	27,71	10,31	15,93	11,53	11,21	5,52
Outros	0,63	0,73	1,88	2,84	3,65	14,38	9,01	1,11	2,16	1,06
Brincad.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,31	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00
Descanso	15,31	7,81	2,19	12,87	24,17	22,50	27,33	28,61	11,93	37,08
Não visível	17,92	7,60	70,31	47,25	13,54	14,58	12,46	0,28	55,31	48,92
<i>Pacing</i>	24,38	26,35	0,63	0,00	3,44	18,44	17,07	32,50	0,21	0,63
Comp. Social	0,10	0,31	0,00	0,00	0,21	0,42	0,21	0,00	0,11	0,00
Parado	8,44	11,25	8,13	14,86	14,27	12,92	9,32	12,78	2,05	2,72

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, A. (1972). Hand-rearing a litter of maned wolves at Los Angeles Zoo. *International Zoo Yearbook*, 12, 170-174.
- Ades, C. (2004). Uma perspectiva ecológica a respeito da regulação do comportamento. *Neurociências*, 1, 15-19.
- Ahola, L., Harri, M., Kasanen, S., Mononen, J. & Pyykonen, T. (2000). Effects of group housing in an enlarged cage system on growth, bite wounds and adrenal cortex function in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*). *Animal Welfare*, 9, 403-412.
- Albert, F.W., Schepina, O., Winter, C., Römppler, H., Teupser, D., Palme, R. et al. (2008). Phenotypic differences in behavior, physiology and neurochemistry between rats selected for tameness and for defensive aggression towards humans. *Hormones and Behavior*, 53, 413-421.
- Aragona, M. & Setz, E. Z. F. (2001). Diet of the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* (Mammalia: Canidae), during wet and dry seasons at Ibitipoca State Park, Brazil. *Journal of Zoology*, 254, 131-136.
- Armitage, K. B. (1986). Individuality, social behavior, and reproductive success in yellow-bellied marmots. *Ecology*, 67, 1186-1193.
- Arnold, S. J. (1995). Monitoring quantitative genetic variation and evolution in captive populations. In J. D. Ballou, M. Gilpin & T. J. Foose (Eds.), *Population management for survival and recovery: analytical methods and strategies in small population conservation* (pp. 295-317). New York: Columbia University Press.
- Ashley, M. V., Willson, M. F., Pergams, O. R. W., O'Dowd, D. J., Gende, S. M. & Brown, J. S. (2003). Evolutionary enlightened management. *Biological Conservation*, 111, 115-123.
- Baker, K. C. (1997). Straw forage material ameliorates abnormal behaviors in adult chimpanzees. *Zoo Biology*, 16, 225-236.
- Baltic, M., Jenni-Eiermann, S., Arlettaz, R. & Palme, R. (2005). A noninvasive technique to evaluate human-generated stress in the black grouse. *Bird Hormones and Bird migrations: Analyzing Hormones in Droppings and egg Yolks and Assessing Adaptations in Long-Distance Migration*, 1046, 81-95.
- Bandeira de Melo, L. F., Sábato, M. A. L., Magni, E. M. V., Young, R. J. & Coelho, C. M. (2007). Secret lives of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus* Illiger 1815): as revealed by GPS tracking collars. *Journal of Zoology*, 271, 27-36.

- Bandeira de Melo, L. F., Sábato, M. A. L., Magni, E. M. V., Young, R. J. & Coelho, C. M. (2009). First observations of nest attendance behavior by wild maned wolves, *Chrysocyon brachyurus*. *Zoo Biology*, 28, 69-74.
- Barboza, P. S., Allen, M. E., Rodden, M. & Pojeta, K. (1994). Feed intake and digestion in the maned wolf *Chrysocyon brachyurus*: consequence for dietary-management. *Zoo Biology*, 13, 375-381.
- Barnard, C. (2007). Ethical regulation and animal science: why animal behaviour is special. *Animal Behaviour*, 74, 5-13.
- Bartmann, W. (1980). Keeping and breeding a mixed group of large South American mammals at Dortmund Zoo. *International Zoo Yearbook*, 20, 271-274.
- Bashaw, M. J., Bloomsith, M. A., Marr, M. J. & Maple, T. L. (2003). To hunt or not to hunt? A feeding enrichment experiment with captive large felids. *Zoo Biology*, 22, 189-198.
- Basile, B. M., Hampton, R. R., Chaudhry, A. M. & Murray, E. A. (2007). Presence of a privacy divider increases proximity in pair-housed rhesus monkeys. *Animal Welfare*, 16, 37-39.
- Bauer, B., Palme, R., Machatschke, I.H., Dittami, J. & Huber, S. (2008). Non-invasive measurement of adrenocortical and gonadal activity in male and female guinea pigs (*Cavia aperea f. porcellus*). *General and Comparative Endocrinology* 156, 482-489.
- Bazille, P. G., Walden, S. D., Konr, B. L. & Gunther, R. (2001). Commercial cotton nesting material as a predisposing factor for conjunctivitis in athymic nude mice. *Lab animal* 30, 40-42.
- Bayne, K. A. L., Dexter, S. L., Hurst, J. K., Strange, G. M. & Hill, E. E. (1993). Kong toys for laboratory primates: are they really an enrichment or just fomites? *Laboratory Animal Science*, 43, 78-85.
- Bean, D., Mason, G. J. & Bateson, M. (1999). Contrafreeloading in starlings: testing the information hypothesis. *Behaviour*, 136, 1267-1282.
- Beattie, V. E., O'Connel, N. E., Kilpatrick, D. J. & Moss, B. W. (2000). Influence of environmental enrichment on welfare-related behavioural and physiological parameters in growing pigs. *Animal Science*, 70, 443-450.
- Beccaceci, M. D. (1991). The maned wolf, *Chrysocyon brachyurus*, in Argentina. In B. Matern (Org.) *Internationale Zuchbuch für den Manhenwolf, Chrysocyon brachyurus (Illiger, 1811)* (pp. 50-56). Frankfurt: Ed. Frankfurt Zoological Gardens.
- Beerda, B., Schilder, M. B. J., Bernadina, W., Van Hooff, J. A. R. A. M., De Vries, H. W. & Mol, J. A. (1999) Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses. *Physiology & Behavior*, 66, 243-254.

- Belentani, S. C. S. (2001). *Ecologia alimentar do lobo-guará Chrysocyon brachyurus (Mammalia: Canidae) no Parque Florestal Salto e Ponte, município de Prata, MG*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São José do Rio Preto.
- Belz, E. E., Kennell, J. S., Czambel, R. K., Rubin, R. T. & Rhodes, M. E. (2003). Environmental enrichment lowers stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 76, 481 – 486.
- Berbare, P. E. B. (2004). *Avaliação longitudinal das concentrações de esteróides fecais em fêmeas de gato-mourisco (Herpailurus yagouaroundi, Lacépède, 1809)*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Berrocal, Y., Pearse, D. D., Singh, A., Andrade, C. M., McBroom, J. S., Puentes, R. et al. (2007). Social and environmental enrichment improves sensory and motor recovery after severe contusive spinal cord injury in the rat. *Journal of Neurotrauma*, 24, 1761-1772.
- Bestelmeyer, S. V. (1998). Linking zoo research and field research for the conservation of the endangered maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *American Zoo and Aquarium Association Annual Conference Proceedings* (pp. 48-54). Tulsa, Oklahoma.
- Bestelmeyer, S. V. (2000). *Solitary, reproductive and parental behavior of maned wolves Chrysocyon brachyurus*. Doctor of Philosophy Thesis, Colorado State University, Fort Collins.
- Biben, M. (1983). Comparative ontogeny of social behavior in three south american canids, the maned wolf, crab-eating fox and bush dog: implication for sociality. *Animal Behaviour*, 31, 814-826.
- Bloomstrand, M., Riddle, K., Alford, P. & Maple, T. L. (1986) Objective evaluation of a behavioral enrichment device for chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Zoo Biology*, 5, 293-300.
- Boinski, S., Gross, T. S. & Davis, J. K. (1999a). Terrestrial predator alarm vocalizations are a valid monitor of stress in captive brown capuchins (*Cebus apella*). *Zoo Biology*, 19, 295-312.
- Boinski, S., Swing, S. P., Gross, T. S. & Davis, J. K. (1999b). Environmental enrichment of brown capuchins (*Cebus apella*): behavioral and plasma and fecal cortisol measures of effectiveness. *American Journal of Primatology*, 48, 49-68.
- Boissy, A. (1995). Fear and fearfulness in animals. *The Quarterly Review of Biology*, 70, 165–191.
- Boonstra, R. & Singleton, G. R. (1993). Population declines in the snowshoe hare and the role of stress. *General and Comparative Endocrinology*, 91, 126–143.

- Bosson, C.O., Palme, R. & Boonstra, R. (2009). Assessment of the Stress Response in Columbian Ground Squirrels: Laboratory and Field Validation of an Enzyme Immunoassay for Fecal Cortisol Metabolites. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82, 291-301.
- Brady, C. A. (1981). The vocal repertoires of the bush dog *Speothos venaticus*, crab-eating fox *Cerdocyon thous* and maned wolf *Chrysocyon brachyurus*. *Animal Behaviour*, 29, 649-669.
- Brady, C. A. (1982). *Social behaviour in crab-eating fox Cerdocyon thous, the maned wolf Chrysocyon brachyurus and the bush dog Speothos venaticus*. Doctor of Philosophy Thesis, The College of Arts and Sciences, Ohio University, Athens.
- Bredy, T. W., Humpartzoomian, R. A., Cain, d. P. & Meaney, M. J. (2003). Partial reversal of the effect of maternal care on cognitive function through environmental enrichment. *Neuroscience*, 118, 571-576.
- Bremner-Harrison, S., Prodohl, P. A. & Elwood, R. W. (2004). Behavioural trait assessment as a release criterion: boldness predicts early death in a reintroduction programme of captive-bred swift fox (*Vulpes velox*). *Animal Conservation*, 7, 313-320.
- Brown, J. L., Wasser, S. K., Wildt, D. E. & Graham, L. H. (1994). Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured non-invasively in feces. *Biology of Reproduction*, 51, 776-786.
- Breland, K. & Breland, M. (1961). The misbehavior of organisms. *American Psychologist*, 16, 681-684.
- Brent, L. & Belik, M. (1997). The response of group-housed baboons to three enrichment toys. *Laboratory Animals*, 31, 81-85.
- Broom, D. M. & Johnson, K. G. (1993). *Stress and animal welfare*. London: Chapman and Hall.
- Burton, M. & Ramsay, E. (1986). Cryptorchidism in maned wolves. *Journal of Zoo Animal Medicine*, 17, 133-135.
- Cabrera, A. (1957) Catalogo de los Mamiferos de America del Sur. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia" e Instituto Nacional de Investigacion de las Ciencias Naturales, Ciencias Zoologicas, Buenos Aires*, 4, 107-110.
- Cai, R., Guo, F., Zhang, J. P., Xu, J. H., Cui, Y. L. & Sun, X. D. (2009). Environmental enrichment improves behavioral performance and auditory spatial representation of primary auditory cortical neurons in rat. *Neurobiology of Learning and Memory*, 91, 366-376.
- Cannon, W. B. (1915). *Bodily changes in pain, hunger, fear and rage*. New York: Appleton.

- Capitanio, J. P. & Lerche, N. W. (1998). Social separation, houseing relocation, and survival in simian AIDS: a retrospective analysis. *Psychosomatic Medicine*, 60, 235-244.
- Carere, C., Groothuis, T. G. G., Möstl, E., Daan, S. & Koolhaas, J. M. (2003). Fecal corticosteroids in a territorial bird selected for different personalities: daily rhythm and the response to social stress. *Hormones and Behavior*, 43, 540–548.
- Carlstead, K. (1996). Effects of captivity on the behavior of wild mammals. In D. G. Kleiman, M. E. Allen, K. V. Thompson & C. S. Lumpkin (Orgs.), *Wild mammals in captivity: principles and techniques* (pp. 317–333). Chicago: The University of Chicago Press.
- Carlstead, K. (1998). Determining the causes of stereotypic behaviors in zoo carnivores: toward appropriate enrichment strategies. In D. J. Shepherdson, J. D. Mellen, M. Hutchins (Orgs.), *Second Nature: environmental enrichment for captive animals*. (pp. 172-183). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Carlstead, K., Brown, J. L. & Strawn, W. (1993^a). Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. *Applied Animal Behaviour Sciences*, 38, 143-158.
- Carlstead, K., Brown, J. L. & Seidensticker, J. (1993^b). Behavioral and adrenocortical responses to environmental changes in leopard cats (*Felis-Bengalensis*). *Zoo Biology*, 12, 321-331.
- Carlstead, K., Fraser, J., Bennett, C. & Kleiman, D.G. (1999a). Black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in US zoos: II. Behavior, breeding success, and mortality in relation to housing facilities. *Zoo Biology*, 18, 35–52.
- Carlstead, K. & Kleiman, D. G. (1998). Behavior profiles of individual animals: a new tool for multi-institutional studies. *American Zoo and Aquarium Association Annual Conference Proceedings* (pp 39-43). Tulsa, Oklahoma.
- Carlstead, K., Mellen, J. & Kleiman, D. G. (1999b). Black rhinoceros (*Diceros bicornis*) in US zoos: I. Individual behavior profiles and their relationship to breeding success. *Zoo Biology*, 18, 17–34.
- Carvalho, C. T. & Vasconcellos, L. E. M. (1995). Disease, food and reproduction of the maned wolf – *Chrysocyon brachyurus* (Illiger) (Carnivora, Caniedae) in southeast Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 12, 627-640.
- Cassali, G. D., Bertagnolli, A. C., Ferreira, E. & Malta, M. C. C. (2009). A simple ductal mammary papilloma in a male maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21, 153-155.
- Caws, C. E., Wehnelt, S. & Aureli, F. (2008). The effect of a new vertical structure in mitigating aggressive behaviour in a large group of chimpanzees (*Pan trogiodytes*). *Animal Welfare*, 17, 149-154.

- Celli, M. L., Tomonaga, M., Udonon, T., Teramoto, M. & Nagano, K. (2003). Tool use task as environmental enrichment for captive chimpanzees. *Applied Animal Behaviour Science*, 81, 171-182.
- Cheal, M., Foley, K. & Kastenbaum, R. (1986). Brief periods of environmental enrichment facilitate adolescent development of gerbils. *Physiology and Behavior*, 36, 1047-1051.
- Chelini, M. O., Souza, N. L., Cortopassi, S. R. G., Felipe, E. C. G. & Oliveira, C. A. (2006). Assessment of the physiologic stress response by quantification of fecal corticosteroids. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 45, 8-11.
- Childs-Sanford, S. E. & Angel, C. R. (2006). Transit time and digestibility of two experimental diets in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and domestic dog (*Canis lupus*). *Zoo Biology*, 25, 369-381.
- Clark, A. B. & Ehlinger, T. J. (1987). Pattern and adaptation in individual behavioral differences. In P. P. G. Bateson & P. H. Klopfer (Orgs.), *Perspectives in ethology* (pp. 1-47). New York: Plenum Press.
- Clubb, R. (2002). *The roles of foraging niche, rearing conditions and current husbandry on the development of stereotypes in carnivores*. PhD Thesis, Oxford University, Oxford.
- Clubb, R. & Mason, G. (2003). Captivity effects on wide-ranging carnivores. *Nature*, 425, 473-474.
- Clutton-Brock, J., Cobert, G. B. & Mills, M. (1976). A review of the family Canidae, with a classification by numerical methods. *Bulletin of the British Museum, Zoology*, 29, 119-199.
- Coelho, C. M., Melo, L. F. B., Sabato, M. A. L., Magm, E. M. V., Hirsch, A. & Young, R. J. (2008). Habitat use by wild maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in a transition zone environment. *Journal of Mammalogy*, 89, 97-104.
- Coimbra-Filho, A. F. (1972). Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil. In Academia Brasileira de Ciências (Org.), *Espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção* pp.13-93). Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências.
- Coleman, K. & Wilson, D. S. (1998). Shyness and boldness in pumpkinseed sunfish: individual differences are contextspecific. *Animal Behaviour*, 56, 927-936.
- Cook, C. J., Mellor, D. J., Harris, P. J., Ingram, J. R. & Matthews, L. R. (2000). Hands-on and hands-off measurements of stress. In G. P. Moberg, J. A. Mench (Orgs.), *The Biology of Animal Stress*. (pp. 123-146). New York: CABI Publishing.
- Cooke, P. S., Holsberger, d. R., Witorsch, R. J., Sylvester, P. W., Meredith, J. M., Treinen, K. A. et al. (2004). Thyroid hormone, glucocorticoids, and prolactin at

the nexus of physiology, reproduction, and toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 194, 309-335.

- Cooper, J. J. & Mason, G. J. (2000). Increasing costs of access to resources cause re-scheduling of behaviour in American mink (*Mustela vison*): implications for the assessment of behavioural priorities. *Applied Animal Behaviour Science*, 66, 135–151.
- Cooper, T. R., Trunkfield, H. R., Zanella, A. J. & Booth, W. D. (1989). An enzyme-linked immunosorbent assay for cortisol in the saliva of man and domestic farm animals. *Journal of Endocrinology*, 123, 13-16.
- Coss, R. G. & Biardi, J. E. (1997). Individual variation in the anti-snake behavior of California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). *Journal of Mammalogy*, 78, 294–310.
- Costa, H. M. A. & Lima, W. S. (1988). *Diocetophyme renale* (Goeze, 1782): ocorrências em Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 40, 243-245.
- Cracknell, J. M., McCort, R. J., Benigni, L. & Knott, C. (2009). Synovial cell sarcoma in a captive maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Veterinary Record*, 164, 501-502.
- Crockett, C. M., Shimoji, M. & Bowden, D. M. (2000). Behavior, appetite, and urinary cortisol responses by adult female pigtailed macaques to cage size, cage level, room change, and ketamine sedation. *American Journal of Primatology*, 52, 63–80.
- Cummings, D., Brown, J. L., Rodden, M. D. & Songsasen, N. (2007). Behavioral and physiologic responses to environmental enrichment in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Zoo Biology*, 26, 331-343.
- Dantzer, R. & Mormed, P. (1983). The arousal properties of stereotypical behavior. *Applied Animal Ethology*, 10, 233-244.
- Daley, B. & Lyndaker-Lindsey, S. (2000). A survey of maned wolf enrichment practices in North American zoos. *American Zoo and Aquarium Association Regional Conference Proceedings* (pp. 17-26). Toledo, Ohio.
- Dawkins, M. S. (1990). From an animal's point of view: motivation, fitness, and animal welfare. *Behavioral and Brain Sciences*, 13, 1-61.
- De Bartolo, P., Leggio, M. G., Mandolesi, L., Foti, F., Gelfo, F., Ferlazzo, F. et al. (2008). Environmental enrichment mitigates the effects of basal forebrain lesions on cognitive flexibility. *Neuroscience*, 154, 444-453.
- De Boer, S. F., Slangen, J. L. & Van der Gugten, J. (1990). Plasma catecholamine and corticosterone levels during active and passive shock-prod avoidance behavior in rats: effects of chlordiazepoxide. *Physiology & Behavior*, 47, 1089–1098.

- De Palma, C., Viggiano, E., Barillari, E., Palme, R., Dufour, A. B., Fantini, C. et al. (2005). Evaluating the temperament in shelter dogs. *Behaviour*, 142, 1307-1328.
- De Ruiter, A. J. H., Koolhaas, J. M., Keijser, J. N., Oortmerssen, G. A. v., Bohus, B. (1992). Differential testosterone secretory capacity of the testes of aggressive and non-aggressive house mice during ontogeny. *Aggressive Behavior*, 18, 149-157.
- Dettmer, E. L., Phillips, K. A., Rager, D. R., Bernstein, I. S. & Fragaszy, D. M. (1996). Behavioral and cortisol responses to repeated capture and venipuncture in *Cebus apella*. *American Journal of Primatology*, 38, 357-362.
- Dias, E. A., Nichi, M. & Guimarães, M. A. B. V. (2008). Comparison of two commercial kits and two extraction methods for fecal glucocorticoid analysis in ocelots (*Leopardus pardalis*) submitted to ACTH challenge. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 28, 329-334.
- Dietz, J. M. (1984). Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Smithsonian Contributions to Zoology*, 392, 1-51.
- Dingemanse, N. J. (2003). *Natural selection and avian personality in a fluctuating environment*. PhD Thesis, Utrecht University, Utrecht.
- Dingemanse, N. J., Both, C., Drent, P. & Tinbergen, J. M. (2004). Fitness consequences of avian personalities in a fluctuating environment. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 271, 847-852.
- Dingemanse, N. J., Both, C., van Noordwijk, A. J., Ruttenm, A. L. & Drent, P. J. (2003). Natal dispersal and personalities in great tits (*Parus major*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 270, 741-747.
- Dishman, D. L., Thomson, D. M. & Karnovsky, N. J. (2009). Does simple feeding enrichment raise activity levels of captive ring-tailed lemurs (*Lemur catta*)? *Applied Animal Behaviour Science*, 116, 88-95.
- Dobson, H. & Smith, R. F. (1995). Stress and reproduction in farm animals. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, 49, 451-461.
- Dow, S. M. (1987). Environmental enrichment for captive primates and foxes. *Applied Animal Behaviour Science*, 18, 383-390.
- Doyle, L. A., Baker, K. C. & Cox, L. D. (2008). Physiological and behavioral effects of social introduction on adult male rhesus macaques. *American Journal of Primatology*, 70, 542-550.
- Drent, P., van Oers, K. & van Noordwijk, A. J. (2003). Realised heritability of personalities in the great tit (*Parus major*). *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 270, 45-51.

- Eckert, R. & Randall, D. (Orgs.) (1988). *Animal Physiology, Mechanisms and Adaptations*. New York: W. H. Freeman.
- Engel, G. L. & Schmale, A. H. (1972). *Conservation withdrawal: a primary regulatory process for organic homeostasis. Physiology, emotions and psychosomatic illness*. New York: Elsevier.
- Fekete, J. M., Norcross, J. L. & Newman, J. D. (2000). Artificial turf foraging boards as environmental enrichment for pair-housed female squirrel monkeys. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 39, 22-26.
- Ferster, C. & Skinner, B. F. (1957). *Schedules of reinforcement*. New York: Appleton Century Crofts.
- Figueira, C. J. M. (1998). Relações entre residentes e ecologia alimentar do lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* em zona rural do sul do Estado de Minas Gerais. *Pesquisa em Foco*, 6, 109-123.
- Fischbacher, M. & Schmid, H. (1999). Feeding enrichment and stereotypic behavior in spectacled bears. *Zoo Biology*, 18, 363-371.
- Fonseca, G. A. B., Rylands, A. B., Costa, C. M. R., Machado, R. B. & Leite, Y. R. (Orgs.) (1994). *Livro Vermelho dos Mamíferos Ameaçados de Extinção*. Fundação Biodiversitas: Belo Horizonte.
- Forthman, D. L., Elder, S. D., Bakeman, R., Kurkowski, T.W., Noble, C. C. & Winslow, S. W. (1992). Effects of feeding enrichment on behaviour of three species of captive bears. *Zoo Biology*, 11, 187-195.
- Fraser, D. F., Gilliam, J. F., Daley, M. J., Le, A. N. & Skalski, G. T. (2001). Explaining leptokurtic movement distributions: intrapopulation variation in boldness and exploration. *American Naturalist* 158, 124–135.
- Freeman, H. & Alcock, J. (1973). Play behavior of a mixed group of juvenile gorillas and orangutans. *International Zoo Yearbook*, 13, 189-194.
- Garcia, A. (1983). On the social behavior of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Boletim de Zoologia, Universidade de São Paulo*, 6, 63-77.
- Gerra, G., Zaimovic, A., Mascetti, G. G., Gardini, S., Zambelli, U., Timpano, M. Et al. (2001). Neuroendocrine responses to experimentally-induced psychological stress in healthy humans. *Psychoneuroendocrinology*, 26, 91-107.
- Gilligan, D. M. & Frankham, R. (2003). Dynamics of genetic adaptation to captivity. *Conservation Genetetics*, 4, 189–197.
- Godin, J. G. J. & Davis, S. A. (1995). Who dares, benefits – predator approach behavior in the guppy (*Poecilia reticulata*) deters predator pursuit. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 259, 193–200.

- Gosling, S. D. (2001). From mice to men: what can we learn about personality from animal research? *Psychological Bulletin*, 127, 45–86.
- Grandin, T. (1998). *Genetics and the behavior of domestic animals*. San Diego: Academic Press.
- Graham, L. H. & Brown, J. L. (1996). Cortisol metabolism in the domestic cat and implications for developing a non-invasive measure of adrenocortical activity in non-domestic felids. *Zoo Biology*, 15, 71-82.
- Greer, E. R., Diamond, M. C. & Tang, J. M. W. (1981). Increase in thickness of cerebral-cortex in response to environmental enrichment in brattleboro rats deficient in vasopressin. *Experimental Neurology*, 72, 366-378.
- Griffin, D. R. (1991). Progress toward a cognitive ethology. In C. A. RISTAU (Org.) *Cognitive Ethology* (pp. 3-17). Hillsdale: Lawrence Erlbaum.
- Grindrod, J. A. E. & Cleaver, J. A. (2001). Environmental enrichment reduces the performance of stereotypic circling behavior in captive common seals (*Phoca vitulina*). *Animal Welfare*, 10, 53-63.
- Haemisch, A., Voss, T. & Gärtner, K. (1994). Effects of environmental enrichment on aggressive behavior, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. *Physiology and Behavior*, 56, 1041-1048.
- Hahn, N. E. (2000). Environmental Enrichment-related Injury in a Macaque (*macaca fascicularis*): Intestinal Linear Foreign Body. *Comparative Medicine*, 50, 556-558.
- Hansen, S. W., Malmkvist, J., Palme, R. & Damgaard, B. M. (2007). Do double cages and access to occupational materials improve the welfare of farmed mink? *Animal Welfare*, 16, 63-76.
- Harri, M., Kasanen, S., Mononen, J. & Sepponen, J. (2000). Preferences of farmed blue foxes for different floor types. *Behavioural Processes*, 49, 111–119.
- Harris, A. P., D'Eath, R. B. & Healy, S. D. (2009). Environmental enrichment enhances spatial cognition in rats by reducing thigmotaxis (wall hugging) during testing. *Animal Behaviour*, 77, 1459-1464.
- Harrison, R. (1964). *Animal Machines*. London: Vincent Stuart.
- Haverbeke, A., Diederich, C., Depiereux, E. & Giffroy, J. M. (2008) Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. *Physiology & Behavior*, 93, 59-67.
- Hay, M. & Mormède, P. (1998). Urinary excretion of catecholamines, cortisol and their metabolites in Meishan and Large White sows: validation as a non-invasive and integrative assessment of adrenocortical and symphoadrenal axis activity. *Veterinary Research*, 29, 119-128.

- Hediger, H. (1950). *Wild Animals in Captivity*. London: Butterworths.
- Hediger, H. (1969). *Man and Animal in the Zoo*. London: Routledge and Kegan Paul.
- Hendry, A. P. & Kinnison, M. T. (1999). The pace of modern life: measuring rates of contemporary microevolution. *Evolution*, 53, 1637–1653.
- Hendriksen, H., Deltimple, N., Pennings, J. M., Piriou, C., Olivier, B. & Oosting, R. S. (2009). Environmental enrichment induces cell proliferation and behavioral recovery in a rat model for PTSD. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 380, 260-261.
- Hoplight, B. J., Sherman, G. F., Hyde, L. A. & Denenberg, V. H. (2001). Effects of neocortical ectopias and environmental enrichment on Hebb-Williams maze learning in BXSB mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, 76, 33-45.
- Hopster, H., van der Werf, J. T. N., Erkens, J. H. F. & Blokhuis, H. J. (1999). Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *Journal of Animal Science*, 77, 708-714.
- Huber, S., Palme, R., Zenzer, W. & Möstl, E. (2003). Non-invasive monitoring of the adrenocortical response in red deer. *Journal of Wildlife Management*, 67, 258–266.
- Hughes, B. & Duncan, I. (1988). The notion of ethological “need”, models of motivation, and animal welfare. *Animal Behaviour*, 36, 1696-1707.
- Hutchinson, J. M. C. (2005). Is more choice always desirable? Evidence and arguments from leks, food selection, and environmental enrichment. *Biological Reviews*, 80, 73–92.
- Inglis, I. R. & Ferguson, N. J. K. (1986). Starlings search for food rather than eat freely available, identical food. *Animal Behaviour*, 34, 614-617.
- Inglis, I. R., Forkman, B. & Lazarus, J. (1997). Free food or earned food? A review and fuzzy model of contrafreeloading. *Animal Behaviour*, 53, 1171-1197.
- Ings, R., Waran, N. K. & Young, R. J. (1997). Effect of wood-pile feeders on the behaviour of captive bush dogs (*Speothos venaticus*). *Animal Welfare*, 6, 145-152.
- International Union for the Conservation of Nature (2008). *IUCN Red List of Threatened Species*. Recuperado em 22 de Maio de 2009, de <<http://www.iucn.org>>.
- Iwata, E., Kikusui, T., Takeuchi, Y. & Mori, Y. (2007). Fostering and environmental enrichment ameliorate anxious behavior induced by early weaning in Balb/c mice. *Physiology & Behavior*, 91, 318-324.

- Jacomo, A. T. D., Kashivakura, C. K., Ferro, C., Furtado, M. M., Astete, S. P., Torres, N. M. et al. (2009). Home range and spatial organization of maned wolves in the Brazilian grasslands. *Journal of Mammalogy*, 90, 150-157.
- Jácomo, A. T. A., Silveira, L. & Diniz-Filho, J. A. F. (2004). Niche separation between the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the crab-eating fox (*Dusicyon thous*) and the hoary fox (*Dusicyon vetulus*) in central Brazil. *Journal of Zoology*, 262, 99-106.
- Jenny, S. & Schmid, H. (2002). Effect of feeding boxes on the behaviour of stereotyping Amur tigers (*Panthera tigris altaica*) in the Zurich Zoo, Zurich, Switzerland. *Zoo Biology*, 21, 573-584.
- Jensen, G. D. (1963). Preference for bar pressing over "freeloading" as a function of number of rewarded presses. *Journal of Experimental Psychology*, 65, 451-454.
- Johansson, B. B. & Belichenko, P. V. (2002). Neuronal plasticity and dendritic spines: effect of environmental enrichment on intact and postischemic rat brain, *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 22, 89-96.
- Jurke, M. H., Czekala, N. M., Lindburg, D. G. & Millard, S. E. (1997). Fecal corticoid metabolite measurement in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Zoo Biology*, 16, 133-347.
- Kau, M. M., Kan, S. F., Wang, J. R., Wang, P. S., Lau, Y. T. & Wang, S. W. (2009). Acute effects of digoxin on plasma aldosterone and cortisol in monkeys. *Metabolism Clinical and Experimental*, 58, 55-61.
- Kirkden, R. D. & Pajor, E. A. (2006). Using preference, motivation and aversion tests to ask scientific questions about animals' feelings. *Applied Animal Behaviour Science*, 100, 29-47.
- Kistler, C., Hegglin, D., Würbel, H. & König, B. (2009). Feeding enrichment in an opportunistic carnivore: The red fox. *Applied Animal Behaviour Science*, 116, 260-265.
- Kleiman, D. G. (1972). Social behavior of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and bush dog (*Speothos venaticus*): a study in contrast. *Journal of Mammalogy*, 53, 791-806.
- Knott, S. A., Cummins, L. J., Dunshea, F. R. & Leury, B. J. (2008). Rams with poor feed efficiency are highly responsive to an exogenous adrenocorticotropin hormone (ACTH) challenge. *Domestic Animal Endocrinology*, 34, 261-268.
- Kofler, J., Pesenhofer, G., Pesenhofer, R. M. & Palme, R. (2007). Effect of the claw trimming procedure on stress reactions in dairy cattle - Comparison of a walk-in crush and a tilt table using faecal cortisol metabolite concentrations and daily milk yield as parameters. *Cattle Practice*, 15, 268-270, Part 3.
- Koh, S., Magid, R., Chung, H., Stine, C. D. & Wilson, D. N. (2007). Depressive behavior and selective downregulation of serotonin receptor expression after

- early-life seizures: Reversal by environmental enrichment. *Epilepsy & Behavior*, 10, 26-31.
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H. et al. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23, 925–935.
- Korhonen, H. & Niemela, P. (1995) Comparison of production results between blue foxes housed with and without platforms. *Agricultural Science in Finland*, 4, 351-361.
- Korhonen, H. & Niemela, P. (2000). Enrichment value of wooden blocks for farmed blue foxes (*Alopex lagopus*). *Animal Welfare*, 9, 177-191.
- Korte, S. M., Buwalda, B., Bouws, G. A. H., Koolhaas, J. M., Mães, F. W. & Bohus, B. (1992). Conditioned neuroendocrine and cardiovascular stress responsiveness accompanying behavioral passivity and activity in aged and in young rats. *Physiology and Behavior*, 51, 815–822.
- Kortland, A. (1960). Can lessons from the wild improve the lot of captive chimpanzees? *International Zoo Yearbook*, 2, 76-81.
- Kralj-Fiser, S., Scheiber, I. B. R., Blejec, A., Moestl, E. & Kotrschal, K. (2007). Individualities in a flock of free-roaming greylag geese: behavioral and physiological consistency over time and across situations. *Hormones and Behavior*, 51, 239-248.
- Krebs, J. R., Kacelkik, A. & Taylor, P. (1978). Test of optimal sampling by sampling by foraging great tits. *Nature*, 275, 27-31.
- Lazarus, R. (1966). *Psychosocial stress and the coping process*. New York: McGraw-Hill.
- Lazarus, R. S. & Folkman, S. (1984). *Stress, Appraisal and Coping*. New York: Springer Publishing Company.
- Leal-Galicia, P., Castaneda, M. & Arias, C. (2007). Long-term exposure to environmental enrichment enhances neurogenesis and improves memory in aged rats. *Journal of Neurochemistry*, 102, 296-296 Suppl. 1.
- Leal-Galicia, P., Castaneda-Bueno, M., Quiroz-Baez, R. & Arias, C. (2008). Long-term exposure to environmental enrichment since youth prevents recognition memory decline and increases synaptic plasticity markers in aging. *Neurobiology of Learning and Memory*, 90, 511-518.
- Lèche, A., Busso, J. M., Hansen, C., Navarro, J. L., Marin, R. H. & Martella, M. B. (2009). Physiological stress in captive Greater rheas (*Rhea americana*): Highly sensitive plasma corticosterone response to an ACTH challenge. *General and Comparative Endocrinology*, 162, 188–191.

- Lefebvre, D., Giffroy, J. M. & Diederich, C. (2009). Cortisol and behavioral responses do enrichment in military working dogs. *Journal of Ethology*, 27, 255-265.
- Lindqvist, C. & Jensen, P. (2008). Effects of age, sex and social isolation on contrafreeloading in red junglefowl (*Gallus gallus*) and white leghorn fowl. *Applied Animal Behaviour Science*, 114, 419-428.
- Line, S. W., Clarke, A. S. & Markowitz, H. (1987). Plasma cortisol of female rhesus monkeys in response to acute restraint. *Laboratory Primate Newsletter*, 26, 1-4.
- Liptrap, R. M. (1993). Stress and reproduction in domestic animals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 697, 275-284.
- Liu, J., Chen, Y., Guo, L., Gu, B., Liu, H., Hou, A. et al. (2006). Stereotypic behavior and fecal cortisol level in captive giant pandas in relation to environmental enrichment. *Zoo Biology*, 25, 445-459.
- Lombardi, J. A. A., Motta-Junior, J. C. (1993). Seed dispersal of *Solanum lycocarpum* St. Hil (Solanaceae) by the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* (Illiger) (Mammalia, Canidae). *Ciência e Cultura*, 45, 126-127.
- Ludes-Fraulob, E. & Anderson, J. R. (1999). Behaviour and preferences among deep litters in captive capuchin monkeys (*Cebus capucinus*). *Animal Welfare*, 8, 127-134.
- Machado, A. B. M., Fonseca, G. A. B., Machado, R. B., Aguiar, L. M. S. & Lins, L. V. (Orgs.). (1998). *Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.
- Maia, O. B. & Gouveia, A. M. G. (2002). Birth and mortality of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) in captivity. *Brazilian Journal of Biology*, 62, 25-32.
- Maia, O. B., Jacomo, A. T. A., Bringel, B. A., Kashivakura, C. K., Oliveira, C. A., Teodoro, L. O. F. et al. (2008). Comparison of serum hormone levels of captive and free-living maned wolves *Chrysocyon brachyurus*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41, 176-179.
- Mantovani, J. E. (2001). *Telemetria convencional e via satélite na determinação das áreas de vida de três espécies de carnívoros da região nordeste do estado de São Paulo*. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Marashi, V., Barnekow, A., Ossendorf, E. & Sachser, N. (2003). Effects of different forms of environmental enrichment on behavioral, endocrinological, and immunological parameters in male mice. *Hormones and Behavior*, 43, 281-292.
- Markowitz, H., Aday, C. & Gavazzi, A. (1995). Effectiveness of acoustic prey-environmental enrichment for a captive African leopard (*Panthera pardus*). *Zoo Biology*, 14, 371-379.

- Markowitz, H. & Laforse, S. (1987). Artificial prey as Behavioral enrichment devices for felines. *Applied Animal Behaviour Science*, 18, 31-43.
- Marliave, J. B., Gergits, W. F. & Aota, S. (1993). F10 Pandalid shrimp – sex determination, DNA and dopamine as indicators of domestication and out crossing for wild pigment pattern. *Zoo Biology*, 12, 435–451.
- Martinez-Mota, R., Valdespino, C., Rebolledo, J. A. R. & Palme, R. (2008). Determination of Fecal Glucocorticoid Metabolites to Evaluate Stress Response in *Alouatta pigra*. *International Journal of Primatology*, 29, 1365-1373.
- Masefield, W. (1999). Forage preferences and enrichment in a group of captive Livingstone's fruit bats, *Pteropus livingstonii*. *Dodo – Journal of the Wildlife Preservation Trusts*, 35, 48-56.
- Mashburn, K. L. & Atkinson, S. (2004). Evaluation of adrenal function in serum and feces of Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*): influences of molt, gender, sample storage, and age on glucocorticoid metabolism. *General and Comparative Endocrinology*, 136, 371–381.
- Mason, G. J. (1991). Stereotypies: a critical review. *Animal Behaviour*, 41, 1015-1037.
- Mason, G. J. & Latham, N. R. (2004). Can't stop, won't stop: is stereotypy a reliable animal welfare indicator? *Animal Welfare*, 13(Suppl), 57–70.
- Mason, G. J., Cooper, J. & Clarebrough, C. (2001). Frustrations of fur-farmed mink. *Nature*, 410, 35 – 36.
- Mattos, P. S. R. (2003). *Epidemiologia e genética populacional do lobo-guará Chrysocyon brachyurus (Illiger, 1811) (Carnívora, Canidae) na região nordeste do estado de São Paulo*. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- May, J. A., Songsasen, N., Azevedo, F. C., Santos, J. P., Paula, R. C., Rodrigues, F. H. G. et al. (2009). Hematology and blood chemistry parameters differ in free-ranging maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) living in the Serra da Canastra National Park versus adjacent farmlands, Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*, 45, 81-90.
- Mcbride, S. D. & Cuddelford, D. (2001). The putative welfare reducing effects of preventing equine stereotypic behaviour. *Animal Welfare*, 10, 173-189.
- McDougall, P. T., Réale, D., Sol, D. & Reader, S. M. (2006). Wildlife conservation and animal temperament: causes and consequences of evolutionary change for captive, reintroduced, and wild populations. *Animal Conservation*, 9, 39–48.
- Mcewen, B. S. (1996). Stressful experience, brain, and emotions: developmental, genetic, and hormonal influences. In M. S. Gazzaniga (Org.) *The Cognitive Neuroscience*. Cambridge: The MIT Press.

- McLean, M. & Smith, R. (2001); Corticotrophin-releasing hormone and human parturition. *Reproduction*, 121, 493-501.
- Mellen, J. & Sevenich Macphee, M. (2001). Philosophy of environmental enrichment: past, present, and future. *Zoo Biology*, 20, 211-226.
- Menargues, A., Urios, V. & Mauri, M. (2008); Welfare assessment of captive Asian elephants (*Elephas maximus*) and Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*) using salivary cortisol measurement. *Animal Welfare*, 17, 305-312.
- Mench, J. A. (1998). Environmental enrichment and the importance of exploratory behavior. In D. J. Shepherdson, J. D. Mellen & M. Hutchins (Orgs.). *Second Nature: environmental enrichment for captive animals* (pp. 30-46). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Meyer-Holzappel, M. (1968). Abnormal behaviour in zoo animals. In: M. W. Fox (Org.) *Abnormal behaviour in Animals* (pp. 476-503). London: Saunders.
- Moberg, G. P. (2000). Biological response to stress: implications for animal welfare. In: G. P. Moberg & J. A. Mench (Orgs.) *The biology of animal stress* (pp. 123-146). New York: CABI Publishing.
- Moberg, G.P. & Mench, J. A. (Orgs.) (2000). *The biology of animal stress*. New York: CABI Publishing.
- Monclus, R., Rodel, H. G., Palme, R., Von Holst, D. & de Miguel, J. (2006). Non-invasive measurement of the physiological stress response of wild rabbits to the odour of a predator. *Chemoecology*, 16, 25-29.
- Mones, A. & Olazarri, J. (1990). Confirmación de la existencia de *Chrysocyon brachyurus* (Illiger) en el Uruguay (MAMMALIA: CARNÍVORA: CANIDAE). *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo XII*, 174, 1-6.
- Moreira, N., Brown, J. L., Moraes, W., Swanson, W. F. & Monteiro-Filho, E. L. A. (2007). Effect of housing and environmental enrichment on adrenocortical activity, behavior and reproductive cyclicity in the female tigrina (*Leopardus tigrinus*) and margay (*Leopardus wiedii*). *Zoo Biology*, 26, 441-460.
- Möstl, E., Choi, H. S. & Bamberg, E. (1985). Stimulation of androgen and oestrogen concentrations in plasma of cows after administration of a synthetic glucocorticoid (flumethasone) at the end of gestation. *Journal of Endocrinology* 105, 121-126.
- Möstl, E. & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, 23, 67-74.
- Motta-Junior, J. C. (1997). Ecologia alimentar do lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus* (Mammalia: Canidae). *Anais do XV Encontro Anual de Etologia*, 15 (pp. 197-209). São Paulo, São Paulo.

- Mülleder, C., Palme, R., Menke, C. & Waiblinger, S. (2003). Individual differences in behaviour and in adrenocortical activity in beef-suckler cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 84, 167-183.
- Munck, A., Guyre, P. M. & Holbrook, N. I. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relationship to pharmacological actions. *Endocrinology Reviews*, 5, 25-44.
- Naka, F., Shiga, T., Yaguchi, M. & Kado, N. (2002). An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Research*, 924, 124-126.
- Natelson, B. H., Ottenweller, J. E., Cook, J. A., Pitman, D., McCarty, R. & Tapp, W. N. (1988). Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiology & Behavior*, 43, 41-46.
- Neuringer, A. (1969). Animals respond for food in the presence of free food. *Science*, 166, 339-341.
- Nimon, A. J. & Broom, D. M. (2001). The welfare of farmed foxes *Vulpes vulpes* and *Alopex lagopus* in relation to housing and management: A review. *Animal Welfare*, 10, 223-248.
- Nowak, R. M. & Paradiso, J. L. (1985). *Mammals of the world. Vol. II*. London: The Johns Hopkins University Press.
- Nowak, R. M. & Paradiso, J. L. (1991). *Mammals of the world. Vol. II*. London: The John Hopkins University Press.
- O'Neil, P. L., Novak, M. A. & Suomi, S. J. (1991). Normalizing laboratory-reared rhesus macaque (*Macaca mulatta*) behavior with exposure to complex outdoor enclosures. *Zoo Biology*, 10, 237-245.
- Oortmerssen, G. A. v. & Busser, J. (1989). Studies in wild house mice III: disruptive selection on aggression as a possible force in evolution. In P. F. Brain, D. Mainardi & S. Parmigiani (Orgs.). *House mouse aggression: a model for understanding the evolution of social behavior* (pp. 87-117). Chur: Harwood Academic Publishers.
- Oortmerssen, G. A. v. & Bakker, T. C. M. (1981). Artificial selection for short and long attack latencies in wild *Mus musculus domesticus*. *Behavior Genetics*, 11, 115-126.
- Overli, O., Korzan, W. J., Höglund, E., Winberg, S., Bollig, H., Watt, M. et al. (2004). Stress coping styles predicts aggression and social dominance in rainbow trout. *Hormones and Behavior*, 45, 235-241.
- Palme, R. (2005). Measuring fecal steroids - guidelines for practical application. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046, 75-80.

- Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, S.M. & Möstl, E. (2005). Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion and noninvasive measurement in fecal samples. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology. Annals of the New York Academy of Sciences*, 1040, 162-171.
- Paquette, D. & Prescott, J. (1988). Use of novel objects to enhance environments of captive chimpanzees. *Zoo Biology*, 7, 15-23.
- Pare, W. P. & Kluczynski, J. (1997). Developmental factors modify stress ulcer incidence in a stress-susceptible rat strain. *Journal of Physiology-Paris*, 91, 105-111.
- Pessutti, C. (1997). *Aspectos da fisiologia digestiva de lobo guará Chrysocyon brachyurus e cachorro-do-mato Cerdocyon thous*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Platt, D. M., Novak, M. A. (1997). Videostimulation as enrichment for captive rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Applied Animal Behaviour Science*, 52, 139-155.
- Prusky, G. T., Reidel, C. & Douglas, R. M. (2000). Environmental enrichment from birth enhances visual acuity but not place learning in mice. *Behavioural Brain Research*, 114, 11-5, 2000.
- Powell, D. M. & Svoke, J. T. (2008). Novel environmental enrichment may provide a tool for rapid assessment of animal personality: a case study with giant pandas (*Ailuropoda melanoleuca*). *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 11, 301-318.
- Prado, A. M., Vasconcellos, A. S. & Ades, C. (2007). Behavioral enrichment reduces stereotypic pacing in maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). *Proceedings of the Eighth International Conference on Environmental Enrichment* (pp. 311-312). San Diego, CA.
- Queirolo, D. & Motta-Junior, J. C. (2007). Prey availability and diet of maned wolf in Serra da Canastra National Park, southeastern Brazil. *Acta Theriologica*, 52, 391-402.
- Raffa, K. F., Havill, N. P. & Nordheim, E. V. (2002). How many choices can your test animal compare effectively? Evaluating a critical assumption of behavioural preference tests. *Oecologia*, 133, 422-429.
- Rasmussen, J. L. & Tilson, R. L. (1984). Food provisioning by adult maned wolves *Chrysocyon brachyurus*. *Zeitschrift Fuer Tierpsychologie*, 65, 346-352.
- Raynaert, R., De Paepe, M. & Peeters, G. (1976). Influence of stress, age and sex on serum growth hormone and free fatty acids in cattle. *Hormone and Metabolic Research*, 8, 109-114.

- Réale, D., Galland, B. Y., Leblanc, M. & Festa-Bianchet, M. (2000). Consistency of temperament in bighorn ewes and correlates with behaviour and life history. *Animal Behaviour*, 60, 589–597.
- Renner, M. J., Rosenzweig, M. R. (1986). Object interactions in juvenile rats (*Rattus norvegicus*): Effects of different experimental histories. *Journal of Comparative Psychology*, 100, 229-236.
- Renner, M. J. & Rosenzweig, M. R. (1987). The golden-mantled ground –squirrel (*Spermophilus-lateralis*) as a model for the effects of environmental enrichment in solitary animals. *Developmental Psychobiology*, 20, 19-24.
- Reynolds, V. & Reynolds, F. (1965). The natural environment and behavior of chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurth*) and suggestions for their care in zoos. *International Zoo Yearbook*, 5, 141-144.
- Rodden, M. D. (1997). Use of behavioral measures to assess reproductive status in maned wolves *Chrysocyon brachyurus*. *Zoo Biology*, 16, 200-220.
- Rodden, M., Rodrigues, F. & Bestelmeyer, S. (2004). Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). In C. Sillero-Zubiri, M. Hoffmann, D. W. Macdonald (Orgs.) *Status Survey and Conservation Action Plan*. Switzerland and Cambridge: Gland.
- Rodden, M. & Rosenthal, M. (1995). Hand rearing and infant development. In N. B. Fletchall, M. Rodden & S. Taylor (Orgs.) *Husbandry manual for the maned wolf, Chrysocyon brachyurus* (pp. 42-51). Virginia: Maned Wolf Species Survival Plan.
- Rödel, H. G., Monclús, R. & von Holst, D. (2006). Behavioral styles in European rabbits: social interactions and responses to experimental stressors. *Physiology and Behavior* 89, 180–188.
- Rodrigues, F. H. G. (2002). *Biologia e Conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF*. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Rodrigues, F. H. G., Hass, A., Lacerda, A. C. R., Grando, L. R. S. C., Bagno, M. A., Bezerra, A. M. R. et al. (2007). Feeding habits of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) in the Brazilian cerrado. *Mastozoologia Neotropical*, 14, 37-51.
- Rosenzweig, M. & Bennett, E. L. (1996). Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioural Brain Research*, 78, 57-65.
- Ruis, M. A. W., Brake, J. H. A.T., Van de Burgwal, J. A., de Jong, I. C., Blokhuis, H. J. & Koolhaas, J. M. (2000). Personalities in female domesticated pigs: behavioural and physiological indications. *Applied Animal Behaviour Science*, 66, 31-47.

- Sábato, M. A. L., Melo, L. F. B., Magnia, E. M. V., Young, R. J. & Coelho, C. M. (2006). A note on the effect of the full moon on the activity of wild maned wolves, *Chrysocyon brachyurus*. *Behavioural Processes*, 73, 228–230.
- Sands, J. & Creel, S. (2004). Social dominance, aggression and faecal glucocorticoid levels in a wild population of wolves, *Canis lupus*. *Animal Behaviour*, 67, 387–396.
- Santos, E. F., Setz, E. Z. F. & Gobbi, N. (2003). Diet of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and its role in seed dispersal on a cattle ranch in Brazil. *Journal of Zoology (London)*, 260, 203–208.
- Sapolsky, R. M. (1992) Neuroendocrinology of the stressresponse. In J. B. Becker, S. M. Breedlove & D. Crews (Eds.). *Behavioral Endocrinology* (pp. 287–324). Cambridge: MIT Press.
- Saudargas, R. A. & Drummer, L. C. (1996). Single subject (small n) research designs and zoo research. *Zoo Biology*, 15, 173–181.
- Schapiro, S. J., Bloomsith, M. A., Kessel, A. L. & Shively, C. A. (1993). Effects of enrichment and housing on cortisol response in juvenile rhesus-monkeys. *Applied Animal Behaviour Science*, 37, 251–263.
- Schapiro, S. J. & Kessel, A. L. (1993). Weight gain among juvenile rhesus macaques – a comparison of enriched and control-groups. *Laboratory Animal Science*, 43, 315–318.
- Schapiro, S. J., Nehete, P. N., Perlman, J. E. & Sastry, K. J. (2000). A comparison of cell-mediated immune responses in rhesus macaques housed singly, in pairs, or in groups. *Applied Animal Behaviour Science*, 68, 67–84.
- Schatz, S. & Palme, R. (2001). Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: a non-invasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary Research Communications*, 25, 271–287.
- Schjolden, J., Backström, T., Pulman, K. G. T., Pottinger, T. G. & Winberg, S. (2005). Divergence in behavioural responses to stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with contrasting stress responsiveness. *Hormones and Behavior*, 48, 537–544.
- Schrijver, N. C. A., Bahr, N. I., Weiss, I. C. & Wurbel, H. (2002). Dissociable effects of isolation rearing and environmental enrichment on exploration, spatial learning and HPA activity in adult rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 73, 209–224.
- Schroll, S., Dehasse, J., Palme, R., Sommerfeld-Stur, I. & Lowenstein, G. (2005). The use of the DAP (R) collar to reduce stress during training of police dogs (*Canis familiaris*): A preliminary study. *Current Issues and Research in Veterinary Behavioral Medicine*: 31–34.

- Schulkin, J., Gold, P. W. & Mcewen, B. S. (1998). Induction of corticotropin-releasing hormone gene expression by glucocorticoids: implication for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load. *Psychoneuroendocrinology*, 23, 219-243.
- Schuurman, T. (1981). Hormonal correlates of aggressive behavior in adult male rats. In P. S. McConnel, G. J. Boer, H. J. Romijn, N. E. Van de Pool, M. A. Corner (Orgs.) *Adaptive capabilities of the nervous system* (pp. 415-420). Amsterdam: Elsevier.
- Schwarzenberger, F. (2007). The many uses of non-invasive faecal steroid monitoring in zoo and wildlife species. *International Zoo Yearbook*, 41, 52-74.
- Segovia, G., Del Arco, A., Garrido, P., de Blas, M. & Mora, F. (2008). Environmental enrichment reduces the response to stress of the cholinergic system in the prefrontal cortex during aging. *Neurochemistry International*, 52, 1198-1203.
- Sgoifo, A., De Boer, S. F., Haller, J. & Koolhaas, J. M. (1996). Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wildtype rats: relationship with aggression. *Physiology and Behavior*, 60, 1403-1407.
- Sgoifo, A., De Boer, S. F., Westenbroek, C., Maes, F. W., Beldhuis, H., Suzuki, T. et al. (1997). Incidence of arrhythmias and heart rate variability in wild-type rats exposed to social stress. *American Journal of Physiology*, 273, H1754-H1760.
- Shepherdson, D. J. (1998) Tracing the path of environmental enrichment in zoos. In d. J. Shepherdson, J. D. Mellen & M. Hutchins (Orgs.) *Second Nature: environmental enrichment for captive animals* (pp. 01-12). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Shepherdson, D. J., Carlstead, K., Mellen, J. D. & Seidensticker, J. (1993). The influence on food presentation on the behavior of small cats in confined environments. *Zoo Biology*, 12, 203-216.
- Shivik, J. A., Palmer, G. L., Gese, E. A. & Osthaus, B. (2009). Captive Coyotes Compared to Their Counterparts in the Wild: Does Environmental Enrichment Help? *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 12, 223-235.
- Shomer, N. H., Peikert, S. & Terwilliger, G. (2001). Enrichment-toy trauma in a New Zealand white rabbit. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 40, 31-32.
- Sih, A., Bell, A. & Johnson, J. C. (2004). Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 372-378.
- Sih, A., Kats, L. B. & Maurer, E. F. (2000). Does phylogenetic inertia explain the evolution of ineffective antipredator behavior in a sunfish-salamander system? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 49, 48-56.

- Silveira, L. (1999). *Ecologia e conservação dos mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas, Goiás*. Dissertação de Mestrado em Ecologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Goiás, Goiás.
- Silveira, L., Furtado, M. M., Torres, N. M., Sollmann, R., Uhl, G., Jacomo, A. T. D. A. (2009). Maned wolf density in a central Brazilian grassland reserve. *Journal of Wildlife Management* 73: 68-71.
- Slotta-Bachmayr, L. & Schwarzenberger, F. (2007). Faecal cortisol metabolites as indicators of stress during training and search missions in avalanche dogs. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 94, 110-117.
- Smith, R. F. & Dobson, H. (2002). Hormonal interactions within the nypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, 23, 75-85
- Sommerfeld, R., Bauert, M., Hillmann, E. & Stauffacher, M. (2006). Feeding enrichment by self-operated food boxes for white fronted lemurs (*Eulemur fulvus albifrons*) in the Masoala exhibit of the Zurich Zoo. *Zoo Biology*, 25, 145-154.
- Songsasen, N., Rodden, M., Brown, J. L. & Wildt, D. E. (2006). Patterns of fecal gonadal hormone metabolites in the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Theriogenology*, 66, 6-7.
- Souza, V. B. (2002). *Efeitos do estresse psicossocial crônico e do enriquecimento ambiental em sagüis (Callithrix penicillata): um estudo comportamental, fisiológico e farmacológico*. Tese de Doutorado, Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Stamps, J. A. (1991). Why evolutionary issues are reviving interest in proximate behavioral mechanism. *American Zoologist*, 31, 333–348.
- Stephens, D. W. & Krebs, J. R. (1986). *Foraging theory*. Princeton: Princeton University Press.
- Stockwell, C. A., Hendry, A. P. & Kinnison, M. T. (2003). Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 94–101.
- Swaigood, R. R., White, A. M., Zhou, X. P., Zhang, H. M., Zhang, G. Q., Wei, R. P. et al. (2001). A quantitative assessment of the efficacy of an environmental enrichment programme for giant pandas. *Animal Behaviour*, 61, 447-457.
- Tang, Y. P., Wang, H., Feng, R., Kyin, M. & Tsien, J. Z. (2001). Differential effects of enrichment on learning and memory function in NR2B transgenic mice. *Neuropharmacology*, 41, 779-790.
- Thiel, D., Jenni-Eiermann, S., Braunisch, V., Palme, R. & Jenni, L. (2008). Ski tourism affects habitat use and evokes a physiological stress response in capercaillie *Tetrao urogallus*: a new methodological approach. *Journal of Applied Ecology*, 45, 845-853.

- Touma, C. & Palme, R. (2005). Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Birds: The Importance of Validation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1046, 54–74.
- Trolle, M., Noss, A. J., Lima, E. D. S. & Dalponte, J. C. (2007). Camera-trap studies of maned wolf density in the Cerrado and the Pantanal of Brazil. *Biodiversity and Conservation*, 16, 1197–1204.
- Touma, C., Sachser, N., Möstl, E. & Palme, R. (2003). Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General and Comparative Endocrinology*, 130, 267-278.
- Touma, C. & Palme, R. (2005). Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Annals of the New York Academy of Science*, 1046, 54–74.
- Trut, L. N. (1999). Early canid domestication: the farm fox experiment. *American Scientist* 87, 160–169.
- Turner, C. A. & Lewis, M. H. (2003). Environmental enrichment: effects on stereotyped behavior and neurotrophin levels. *Physiology and Behavior*, 80, 259-266.
- Turner, P. V. & Grantham, L. E. (2002). Short-term effects of an environmental enrichment program for adult cynomolgus monkeys. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science*, 41, 13-17.
- Ursin, H. & Olff, M. (1995). Aggression, defense, and coping in humans. *Aggressive Behavior*, 2, 13–19.
- Ursin, H. (1998). The psychology in psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology*, 23, 555–570.
- Universities Federation For Animal Welfare (2000). *Guia para o enriquecimento das condições ambientais do cativeiro* (S. Celotti, Trad.). São Paulo: Sociedade Zoófila Educativa.
- Van de Weerd, H. A., Van Loo, P. L. P., Van Zutphen, L. F. M., Koolhaas, J. M. & Baumans, V. (1997). Nesting material as environmental enrichment has no adverse effects on behavior and physiology of laboratory mice. *Physiology and Behavior*, 62, 1019-1028.
- Vasconcellos, A. S., Guimarães, M. A. B. V., Oliveira, C. A., Pizzutto, C. S. & Ades, C. (2009). Environmental enrichment for maned wolves: group and individual effects. *Animal Welfare*, 18, 289-300.
- Veado, B. V. (1994). *Observações a respeito do comportamento parental em lobos-guarás Chrysocyon brachyurus (Illiger) (Canidae) em cativeiro no Zoológico da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, Minas Gerais*. Monografia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- Veeder, C. L., Taylor & D. K. (2009). Injury related environmental enrichment in a dog (*Canis familiaris*): gastric foreign body. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 48, 76-78.
- Vegas, O., Fano, E., Brain, P. F., Alonso, A. & Azpiroz, A. (2006). Social stress, coping strategies and tumor development in male mice: behavioral, neuroendocrine and immunological implications. *Psychoneuroendocrinology*, 31, 69–79.
- Velloso, A. L. (1991). *Captive breeding and behaviour of maned wolf (Chrysocyon brachyurus) in brazilian zoos*. Monography, Jersey Wildlife Preservation Trust, Jersey.
- Velloso, A. L., Wasser, S. K., Monfort, S. L. & Dietz, J. M. (1998). Longitudinal Fecal Steroid Excretion in Maned Wolves (*Chrysocyon brachyurus*). *General and Comparative Endocrinology*, 112, 96-107.
- Verkerk, G. A., Phipps, A. M., Carragher, J. F., Matthews, L. R. & Stelwagen, K. (1998). Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Animal Welfare*, 7, 77-86.
- Viau, P. (2003). *Estudo da função ovariana em fêmeas de onça-pintada (Panthera onca, Linnaeus, 1758) mantidas em cativeiro, por meio da extração e quantificação de esteróides fecais*. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Vynne, C. & Kinsella, J. M. (2009). First record of entodiniomorph ciliates in a carnivore, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), from Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40, 382-384.
- Wagner, A. K., Kline, A. E., Sokoloski, J., Zafonte, R. D., Capulong, E. & Dixon, C. E. (2002). Intervention with environmental enrichment after experimental brain trauma enhances cognitive recovery in male but not female rats. *Neuroscience Letters*, 334, 165-168.
- Walsh, R. N. & Cummins, R. A. (1976). The Open-Field Test: A Critical Review. *Psychological Bulletin*, 83, 482-504.
- Wasser, S. K., Hunt, K. E., Brown, J. L., Cooper, K., Crockett, C. M., Bechert, U. et al. (2000). A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology*, 120, 260-275.
- Wasser, S. K., Velloso, A. L. & Rodden, M. D. (1995) Using fecal steroids to evaluate reproductive function in female maned wolves. *Journal of Wildlife Management*, 59, 889-894.
- Wechsler, B. (1995). Coping and coping strategies: a behavioural view. *Applied Animal Behaviour Science*, 43, 123–34.

- Wells, D. L. (2009) Sensory stimulation as environmental enrichment for captive animals: A review. *Applied Animal Behaviour Science*, 118, 1-11
- Wells, D. L. & Irwin, R. M. (2008) Auditory stimulation as enrichment for zoo-housed Asina Elephants (*Elephas maximus*). *Animal Welfare*, 17, 57-69.
- Wells, D. L. & Irwin, R. M. (2009). The Effect of Feeding Enrichment on the Moloch Gibbon (*Hylobates moloch*). *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 12, 21-29.
- Whitten, P. L., Stavisky, R., Aureli, F. & Russell, E. (1998). Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *American Journal of Primatology*, New York, 44, 57-69.
- Wiedenmayer, C. (1998). Food hiding and enrichment in captive Asian elephants. *Applied Animal Behaviour Science*, 56, 77-82.
- Wielebnowski, N. C. (1999). Behavioral differences as predictors of breeding status in captive cheetahs. *Zoo Biology*, 18, 335–349.
- Wielebnowski, N. C., Fletchall, N., Carlstead, K., Busso, J. M. & Brown, J. L. (2002a) Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioural factors in the North American clouded leopard population. *Zoo Biology*, 21, 77-98.
- Wielebnowski, N. C., Ziegler, K., Wildt, D. E., Lukas, J. & Brown, J. L. (2002b). Impact of social management on reproductive, adrenal and behavioural activity in cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Animal Conservation*, 5, 291-301.
- Wilson, D. S., Clark, A. B., Coleman, K. & Dearstyne, T. (1994). Shyness and boldness in humans and other animals. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 442–445.
- Wilson, L. L., Terosky, T. L., Stull, C. L. & Stricklin, W. R. (1999). Effects of individual housing design and size on behavior and stress indicators of special-fed Holstein veal calves. *Journal of Animal Science*, 77, 1341-1347.
- Wingfield, J. C., Hunt, K., Breuner, C., Dunlap, K., Fowler, G. S., Freed, L. et al. (1997). Environmental stress, field endocrinology, and conservation biology. In J. R. Clemmons & R. Buchholz R (Orgs.) *Behavioral Approaches to Conservation in the Wild* (pp. 95-131). Cambridge: Cambridge University Press.
- Ziegler, T. E., Scheffler, G., Wittwer, D. J., Schulz-Darken, N., Snowdon, C. T., Abbott, D. H. (1996). Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of callitrichids, *Saguinus oedipus* and *Callitrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. *Biology of Reproduction*, 54, 91-99.
- Yerkes, R. M. (1925). *Almost Human*. New York: Century.

Young, R. J. (2003). *Environmental enrichment for captive animals*. Oxford: Blackwell Science.