

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

GRAZIELE BRAIDO ARCURI

Efeitos do estresse no manejo reprodutivo em cães machos de trabalho militar

**Pirassununga
2015**

GRAZIELE BRAIDO ARCURI

Efeitos do estresse no manejo reprodutivo em cães machos de trabalho militar

“Versão Corrigida”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária

Orientador:

Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins

Pirassununga

2015

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ARCURI, Grazielle Braido

Título: Efeitos do estresse no manejo reprodutivo em cães machos de trabalho militar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por permitir a realização de um sonho.

A minha mãe, pelo exemplo de honestidade, perseverança, força, dedicação, alegria e amor, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu eterno companheiro, cúmplice, amigo, amor e namorado Thiago. Obrigada pelo carinho, compreensão, convivência, dedicação e muita paciência, por estar ao meu lado na realização de mais um sonho e crescimento profissional. Sou grata pela sua presença iluminando em meu caminho.

A Profa. Dra. Daniele dos Santos Martins pela orientação desta Dissertação, pela amizade, disponibilidade, dedicação, confiança, apoio e oportunidade. Exemplo de dedicação, responsabilidade, comprometimento e amor ao ensino e a pesquisa.

A minha grande amiga Camila, agradeço pelo apoio, carinho e companhia. Obrigada pela motivação e por sempre estar presente em todos os momentos. Guardarei você sempre no meu coração.

Ao Batalhão de Operações Especiais de Policiamento – BAEP por permitir a realização deste projeto.

Aos Adestreadores do Canil – BAEP, Sgt PM Neimar, Cb PM Everton, Cb PM Sergio, Cb PM Matias, Cb PM Cesetti, Cb PM Souza, Sd PM Romero, Cb PM Quintas, Cb PM Da Silva, Cb PM Crispim, Cb PM Rogério, agradeço a paciência e colaboração que foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto. Parabéns pelo excelente trabalho e amor com os cães.

Aos Enfermeiros Veterinários, Cb PM Ailton, Cb PM Ferreira e Cb PM Renato, obrigada pela atenção e colaboração com os animais.

Aos animais do Canil- BAEP, Connors, Lotan, Falcon, Gringo, Pegus, Kelvin, Egar e Thor.

Aos professores da Pós Graduação – FZEA, que se dedicaram a ensinar de forma plausível, sempre dispostos a esclarecer dúvidas.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

A todos os amigos e colegas de Pós Graduação, com quem pude aprender e passar bons momentos.

“Se queres colher a curto prazo, plante cereais”

“Se queres colher a longo prazo, plante árvores frutíferas”

“Mas se queres colher para sempre, treine e eduque o homem.”

" Provérbio Chinês"

RESUMO

ARCURI, G. B. **Efeitos do estresse no manejo reprodutivo em cães machos de trabalho militar**. 2015. 58f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

O presente projeto levantou uma discussão a respeito das condições psicológicas, fisiológicas e éticas pelas quais passam os cães de trabalho da Polícia Militar, com foco em investigar se a rotina de trabalho leva a condições de estresse e a influência desses fatores no desempenho reprodutivo e na qualidade de vida dos animais. O estudo foi realizado no Canil da Polícia Militar de Campinas, com a participação de oito cães machos de quatro diferentes raças (2 Pastor Alemão, 2 Belga Malinois, 2 Dobermann e 2 Rotwailer), sendo divididos em dois períodos: Período trabalho – animais que estavam em treinamento e trabalho e Período controle – animais que estavam no dia de descanso. Foram colhidas amostras de saliva para a dosagem de cortisol no método de eletroquimioluminescência, fez-se a observação comportamental através da elaboração e análise de um etograma de trabalho e houve a coleta e análise de sêmen. Os resultados mostraram concentrações médias de cortisol salivar no Período Controle de 0,361 à 0,438µg/dl e no Período trabalho 0,312 à 0,592 µg/dl, sendo os maiores valores encontrados após o retorno do trabalho. Nas avaliações de comportamento observamos que na maior parte do período, os animais apresentaram-se em repouso e poucos comportamentos estereotipados foram destacados e as raças Pastor Alemão, Belga Malinois e Dobermann apresentaram parâmetros seminais desejáveis. A raça Rotwailer apresentou cortisol elevado, comportamentos estereotipados e maior taxa de anormalidades espermáticas, portanto acreditamos que não seja a raça mais indicada para os trabalhos desenvolvidos pelas polícias. Nosso estudo indica que os cães de trabalho avaliados adaptados ao ambiente desde filhote, apresentam boa capacidade de adaptação ao ambiente de confinamento rotina de trabalho e treinamento, uma vez que não sofrem distresse.

Palavras-Chaves: Cães de trabalho, cortisol Salivar, estresse, bem estar animal.

ABSTRACT

ARCURI, G. B. **Effects of stress on reproduction in male dogs of military working.** 2015. 58f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015.

This project raised a discussion about the psychological and ethical conditions under which pass the military working dogs, on investigating whether routine work leads to stress conditions and the influence of these factors on reproductive performance and quality of animals life. The study was conducted at military police Kennel in Campinas, using 8 male dogs of 4 different races (2 German Shepherd, 2 Belgian Malinois, 2 Dobermann and 2 Rotwailer), divided into two periods: Period work - animals that were in training and work and control period - animals that were in day off. Saliva samples were collected for cortisol measurement in eletroquimioluminescence method, behavioral observation through the preparation and analysis of a ethogram and collection and analysis semen. Our results showed average concentrations of salivary cortisol in the control period of 0.361 to 0.438 and 0.312 to 0.592 working period, with the highest values found after returning from work. In behavioral assessments we observed that in most of the period, the animals showed up at rest and few stereotyped behaviors were highlighted and. The breeds German Shepherd, Belgian Malinois and Dobermann showed desirable semen parameters, which did not occur in Rotwailer. The Rotwailer breed had high cortisol, stereotyped behaviors and higher rate of sperm abnormalities, so we believe that it is not the most suitable breed for the military working dog. Our study indicates that the assessed working dogs adapted to the environment as a puppy, show good ability to adaptation to environmental containment routine work and training, since it does not suffer distress.

Key Words: Working dog, salivary cortisol, stress, animal welfare.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média dos tempos em segundos observados para cada comportamento, independente do período de atividade. As letras indicam as diferenças de cada comportamento em relação à raça. O sinal asterisco (*) indica diferença estatística, valor de $p < 0,05$	39
Tabela 2. Média dos tempos observados para cada comportamento e sua interação no período controle e período Trabalho com o período de observação (manhã ou tarde). As letras indicam as diferenças de cada comportamento em relação ao período de trabalho ou controle e período de observação. O sinal asterisco (*) indica diferença estatística, valor de $p < 0,05$	40
Tabela 3. Concentração de cortisol salivar ($\mu\text{g/dl}$) nas diferentes raças (considerando os horários 07:00 e 18:00).....	42
Tabela 4. Concentração de cortisol salivar ($\mu\text{g/dl}$) nas diferentes raças no período de trabalho.....	43
Tabela 5. Média do cortisol salivar ($\mu\text{g/dl}$) por horário de coleta no Período Trabalho. As letras indicam a diferença entre eles.....	44
Tabela 6. Média do cortisol salivar ($\mu\text{g/dl}$) e sua interação entre os horários de coletas e raças avaliadas. As letras maiúsculas mostra a diferença nas colunas e letras minúsculas diferença nas linhas. Desvio padrão 0,220 e valores de $p < 0,05$	45
Tabela 7. Resultados descritivos da avaliação seminal I.....	47
Tabela 8. Resultados descritivos da avaliação seminal II.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos ilustrativas do canil do 1º Batalhão de Ações Especiais de Policiamento (BAEP) da Polícia Militar, Campinas/SP. Em A destacamos a área de disposição de todos os boxes, em B e C o canil e em D e E elucidamos as instalações do canil solário e área coberta.....	29
Figura 2. Fotografias ilustrativas destacando o tubo para coleta e um cão como demonstrado o procedimento.....	31
Figura 3. Foto ilustrativa do funil de vidro e tubo coletor cônico de 15ml utilizado na coleta de sêmen.....	33
Figura 4. Gráfico elucidando a média dos tempos (segundos) observados para cada comportamento nas diferentes raças independente do período de atividade.....	39
Figura 5. Média dos comportamentos observados no Período Controle e Trabalho durante o Período 1 (07h00) e o período 2 (18h00).....	39
Figura 6. Médias dos valores de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) coletados nos Períodos de Trabalho e Folga.....	41
Figura 7. Médias dos valores de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) coletados às 07:00 e às 18:00, para os dois Períodos (Trabalho e Controle).....	42
Figura 8. Comparação entre as médias dos valores de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) nas diferentes raças, coletados às 07h00 e 18h00.....	43
Figura 9. Comparação entre as médias dos valores de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) coletados no Período de Trabalho nas diferentes raças.....	44
Figura 10. Comparação entre as médias dos valores de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) no Período Trabalho em diferentes horários de coleta.....	45
Figura 11. Médias dos valores de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) e sua interação entre os horários das coletas e as raças avaliadas.....	46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Identificação animal X raça envolvidos no trabalho.....	28
Quadro 2. Descrição das coletas diárias de cortisol salivar no período trabalho (PT). I - TR: 1ª coleta de trabalho, II- TR: 2ª coleta de trabalho e III - TR: 3ª coleta de trabalho.....	31
Quadro 3. Descrição das coletas diárias de cortisol salivar no período controle (PC). I - FG: 1ª coleta de folga, II- FG: 2ª coleta de folga e III - FG: 3ª coleta de folga.....	32
Quadro 4. Comportamentos observados nos animais.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SNC	Sistema nervoso central
HHA	Hipotálamo hipófise adrenal
CRH ou HLC	Hormônio liberador de corticotropina
ACTH	Hormônio adrenocorticotropico
ADH	Vasopresina
CBG	Proteína transportadora de corticosteróide
RIA	Radioimunoensaio
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
HPA	Hipotálamo pituitária adrenal
HPG	Hipotálamo pituitária gonadal
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
FSH	Hormônio folículo estimulante
LH	Hormônio luteinizante
BEA	Bem estar animal
BAEP	Batalhão de ações especiais de policiamento

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVO.....	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
3.1. Estresse.....	16
3.2. Fisiologia do estresse.....	17
3.3. Cortisol.....	19
3.4. Estresse e Reprodução.....	21
3.5. Bem estar e Comportamento animal.....	23
3.6. Cães e a atividade policial.....	26
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1. Animais.....	28
4.2. Metodologia.....	30
4.2.1. Protocolo de coleta de cortisol.....	30
4.3. Parâmetros reprodutivos.....	32
4.3.1. Consistência Testicular.....	32
4.3.2. Análise do Ejaculado	32
4.4. Avaliação comportamental	34
4.5. Avaliação estatística	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1. Análise Comportamental	37
5.2. Análise do Cortisol	41
5.3. Análise de Sêmen	46
6. DICUSSÃO.....	47
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
8. CONCLUSÃO.....	52
9. REFERÊNCIAS.....	53

1. Introdução

Os cães são membros ativos das sociedades desde épocas antigas e têm servido como protetores e companhia, inclusive ajudando o homem em seus trabalhos (BROOM e FRASER, 2010). Cães com treinamento especializado são utilizados na ciência forense para ajudar a solucionar crimes, através de seu faro apurado, identificando explosivos, drogas ou substâncias químicas, ou até o cheiro de um indivíduo (BURGHARDT, 2003; HAVERBEKE, 2008). São animais que se destacam pela capacidade de aprendizado e vem sendo explorados quanto sua habilidade. Devido a esta maior proximidade com o ser humano os cães tornam-se mais susceptíveis a comportamentos e alterações de saúde que antes eram exclusivos do homem, como o sedentarismo, a obesidade e o estresse (BEERDA et al., 1997; HAVERBEKE, 2008).

O estresse surge como uma consequência direta dos persistentes esforços adaptativos do organismo a manter a homeostasia frente a uma situação adversa, seja ela física ou emocional, interna ou externa, sendo este um mecanismo natural de defesa do organismo para que ele possa passar por desafios (CARRAMENHA e CARREGARO, 2012). A resposta ao estresse envolve uma ampla integração do organismo, devido a alterações no eixo hipotálamo-hipofise-adrenal, e a amplitude da resposta hormonal pode estar correlacionada com a gravidade do estímulo e indicar qualquer alteração que o organismo está a responder (TILBROOK et al., 2000). Normalmente, um hormônio poderá ter um papel fundamental na função corporal normal (por exemplo, a reprodução) e o estresse pode deletoriamente alterar o sinal de um hormônio impedindo sua função normal (BEERDA et al., 1997; BONDAN e ORSINI, 2006; DOBSON e SMITH, 2002).

Hans Selye (1952), considerado pioneiro no estudo do estresse, descreveu uma reação adaptativa única e geral do corpo quando submetido a agentes estressores, que foi denominada de “Síndrome de Adaptação Geral” e pode ser dividida em três estágios: a primeira fase consiste, na fase de alarme ou excitação, que ocorre quando o organismo reconhece o estímulo como estressante. É caracterizada por aumento da capacidade orgânica em responder ao agente agressor, com ativação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) e do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), resultando em aumento na secreção de catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) e de glicocorticóides. Se o estímulo for mantido, a capacidade de reação diminui e o organismo desenvolve mecanismos adaptativos que corresponde à segunda fase, denominada fase de resistência. Entretanto, quando não ocorre a adaptação o organismo torna-se suscetível a distúrbios e desenvolve na terceira fase,

denominada fase de exaustão. Esta é caracterizada por alterações renais, cardiovasculares, gastrintestinais e/ou imunológicas e reprodutivas. Este sistema neuroendócrino responsivo ao estresse ajuda o organismo a se adaptar ao aumento de demandas e manter a homeostase após o desafio, mas também é vital para apoiar o normal funcionamento fisiológico (SEYLE, 1959; BONDAN e ORSINI, 2006). Um aumento na concentração plasmática de glicocorticóides é um dos fatores mais importantes para a classificação de situações estressantes, embora outros eventos fisiológicos podem ocorrer simultaneamente (BODNARIU, 2008).

A incapacidade de um animal interagir com o ambiente em igualdade de condições devido a fatores de estresse, tem sido apontada por diferentes autores a correlação positiva existente entre o estresse e a reprodução (DOBSON e SMITH, 1995; NETO et al., 2006). A principal manifestação do estresse em animais machos é a significativa queda de qualidade do sêmen, expressa pela redução da motilidade espermática pelo aumento do número de espermatozoides mortos, aumento das alterações na membrana espermática, elevado grau de retenção de gota citoplasmática e alterações acrossomais que indicam má função epididimária (BAPTISTA SOBRINHO et al., 2009).

O emprego de cães em ambientes de trabalho exige uma intensidade de esforço diferente do que o necessário para um animal de estimação, exposição ou de laboratório, ocorrendo modificações fisiológicas, morfológicas e comportamentais (MOSTL e PALME, 2002; BURGHARDT, 2003). Em função da atual utilidade para os seres humanos, há cada vez mais interesse em temas de bem-estar animal, não só para pesquisa, mas também em discussões públicas. As perguntas de como definir bem-estar animal e como medi-la ainda estão em debate, portanto há necessidade de mais pesquisas que contribuam para chegar em indicadores mais confiáveis (BEERDA et al., 1999; MOSTL e PALME, 2002; HAVERBEKE, 2008)

Determinar os níveis de estresse pelas quais esses cães passam é de extrema importância para manutenção do bem-estar em padrões aceitáveis, de forma que não comprometam a qualidade de vida do animal (SPANGENBERG et al., 2006; HAVERBEKE, 2008). O conhecimento do mecanismo pelo qual o estresse pode afetar a qualidade seminal, e do seu impacto na fertilidade dos cães, pode levar a propostas que melhorem a eficácia no manejo dos cães de trabalho, buscando preservar a ética e o bem-estar, necessários ao convívio interespecíes, juntamente com um melhor desempenho nas tarefas, sem dúvida, uma contribuição importante às áreas policiais de segurança pública e combate ao crime, além da relevância na compreensão das necessidades físicas, biológicas e na qualidade de vida dos animais que são destinados para este tipo de função.

2. Objetivo

2.1. Objetivo Geral

O estudo tem como objetivo avaliar o efeito do estresse no manejo reprodutivo de cães policiais de trabalho, mensurados através da análise comportamental, níveis de cortisol salivar e avaliação dos parâmetros seminais.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliação comportamental através de etograma, nos períodos de trabalho e descanso;
- Avaliação dos níveis de cortisol salivar secretados pelos animais no período de trabalho e descanso;
- Análise da qualidade do sêmen;
- Avaliação das baias, a fim de detectar efeitos externos que possam influenciar na reprodução dos cães.

3. Revisão de Literatura

3.1. Estresse

O termo estresse é reportado nos dias de hoje como o grande responsável por males cotidianos ou clínicos que afetam os seres humanos e os animais, tais como cansaço, irritação, alterações súbitas de humor, agressividades, desinteresse sexual, depressão, ansiedade, fobias, lesões de esforço repetido, alergia, melancolia, entre outros (ETIM et al., 2013). No início das civilizações, entretanto, o homem considerava o animal um ser bruto que não poderia ser atingido pelo estresse. No entanto, aos poucos foi aceito que os animais também sofrem devido à carga de estresse, desenvolvendo patologias similares aos humanos, podendo sucumbir a doenças, sofrer atraso no crescimento ou apresentar baixo desempenho reprodutivo (MOBERG, 1996; BEERDA et al., 1997).

O organismo vivo está normalmente em equilíbrio, o qual é responsável pelo desencadeamento normal das funções fisiológicas. Este estado de equilíbrio denomina-se homeostase. Segundo DUKES (1996), homeostase é uma propriedade autorreguladora do organismo que permite a manutenção do seu equilíbrio interno e essencial à sua própria existência. O estresse deve ser entendido como um processo fisiológico, neuro-hormonal, pelo qual passam os seres vivos para enfrentar uma mudança ambiental, na tentativa de se adaptar às novas condições e, assim, manter a sua homeostasia. Trata-se de um estado manifestado por um conjunto de respostas específicas do organismo e desencadeado por diferentes tipos de agentes, que são denominados estressores (BONDAN; ORSINI, 2006; MOBERG, 2000; PACHALY et al., 1993)

Os agentes estressantes podem ser classificados como somáticos (sons, odores, pressão, frio, estiramento anormal de tendões e músculos e efeitos de drogas ou agentes químicos), psicológicos (apreensão, ansiedade, medo, fúria e frustração), comportamentais (superpopulação, disputas hierárquicas, falta de contato social e mudanças no ritmo biológico) e variados (má nutrição, parasitos, infecções, cirurgias, imobilização química ou física e confinamento) (FOWLER, 1986; MOBERG, 2000).

A palavra "Estresse" vem do inglês "Stress". Esse termo foi usado inicialmente na física para traduzir o grau de deformidade sofrido por um material quando submetido a um esforço ou tensão (LIPP, 2003). Hans Selye foi o primeiro a utilizar o termo estresse em 1926, ao notar um conjunto de sintomas comuns em determinados pacientes, tais como, falta de apetite, hipertensão arterial, desânimo e fadiga. Ele transpôs este termo para a medicina e

biologia, significando “esforço de adaptação do organismo” para enfrentar situações que considere ameaçadoras a sua vida e ao seu equilíbrio interno.

De acordo com Selye (1946), a “síndrome geral da adaptação” desencadeia-se em três fases: Fase de alarme: a reação do alarme inicia-se quando o animal se confronta inicialmente com um estressor, ocorre no organismo um desequilíbrio da homeostase; a Fase de resistência: ocorre quando o estressor é de longa duração, ou sua intensidade é demasiada para a resistência do animal, o organismo tenta restabelecer a homeostase de um modo reparador; e Fase do esgotamento: Se a resistência do animal não for suficiente para lidar com a fonte de estresse, ou se outros estressores ocorrerem concomitantemente, o processo evoluirá e a fase de exaustão ocorrerá. Resultado disso há falha dos mecanismos de adaptação; esgotamento por sobrecarga fisiológica; morte do organismo.

O impacto fisiológico e comportamental de um agente estressor é altamente dependente da percepção e do tipo de resposta comportamental do indivíduo. Muitos tipos de agentes estressores agudos podem acarretar um aumento geral de excitação, que, por sua vez, tem o potencial de trazer benefícios fisiológicos e psicológicos para o animal. O mecanismo fisiológico do estresse por si só não é considerado totalmente indesejável ao organismo. Os glicocorticóides liberados em resposta a situações que rotineiramente são consideradas estressantes são desejáveis, e a normalidade nos níveis depende da concentração e da duração do aumento (BROOM e JOHNSON, 1993; McEWEN, 2000).

Durante um curto período de estresse, os glicocorticóides podem facilitar a mobilização energética e alterar o comportamento. Entretanto, o estresse crônico (períodos prolongados de altas concentrações de cortisol) ou estresse intermitente, podem cobrar altos custos biológicos, como diminuição da aptidão individual por imunossupressão e atrofia dos tecidos, diminuição da capacidade reprodutiva e alterações comportamentais, também conhecidas como estereotipias (MASON, 1993; BEERDA et al., 1997).

3.2. Fisiologia do estresse

A estimulação do organismo por um estressor tem a participação de órgãos e sistemas específicos. O animal responde por meio de três sistemas principais: o sistema motor voluntário, o sistema nervoso autônomo e o sistema neuroendócrino (MOBERG, 2000).

O estressor gera no organismo um desequilíbrio que é percebido por neurorreceptores e é conduzido ao SNC na forma de impulsos nervosos. A informação é processada e transmitida até as áreas motoras, que repassam a informação aos nervos periféricos para gerar

uma resposta imediata por parte do animal, a qual geralmente segue um padrão característico da espécie. Assim, o animal pode reagir adotando uma postura defensiva ou protetora, ou seja, esquivando-se, escondendo-se, vocalizando e até tentando fugir (FOWLER, 1986; CUNNINGHAM, 2004; MATTERI et al., 2000).

O SNC, após desencadear a resposta do sistema motor voluntário pode estimular em resposta ao agente estressor, o sistema nervoso autônomo simpático, o qual atua sobre a medula adrenal e determina a liberação de grande quantidade de catecolaminas no sangue (MOBERG, 2000; ROMERO e BUTLER, 2007). Estas catecolaminas acabam por induzir a uma série de eventos no organismo, determinados pela sua interação com seus receptores específicos nos órgãos-alvo (MOSTL; PALME, 2002). Assim, a atuação simpática causa, de forma geral, o estado de alerta dos animais, promovendo aumento da frequência e da força de contração cardíaca, contração esplênica e diminuição da circulação sanguínea para regiões periféricas na intenção de aumentar a distribuição de sangue para os órgãos vitais do organismo (MOBERG, 2000; CUNNINGHAM, 2004). Causa também aumento da frequência respiratória, para uma maior captação e disponibilização de oxigênio para o organismo; liberação de glicose pelo fígado, na tentativa de aumentar a disponibilidade de energia para os músculos; dilatação pupilar, para aumentar a eficiência visual; e aumento de linfócitos circulantes, já preparando o organismo para possíveis danos. No entanto, passada a fase de alarme, o organismo deve retornar gradualmente ao seu equilíbrio. Inicia-se, assim, a atividade parassimpática (DUKES, 1996).

A terceira via de resposta, a neuroendócrina, ocorre poucos minutos depois, após uma estimulação hipotalâmica pelo estressor para a síntese e liberação do hormônio liberador de corticotropina (CRH ou HLC), que deve atuar sobre a adeno-hipófise, induzindo a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH ou HACT) pela glândula. O ACTH possui sua ação sobre o córtex adrenal, promovendo a formação e liberação de glicocorticoides (cortisol e corticosterona) no sangue, a fim de atribuir um suporte adicional ao organismo nesta situação desfavorável. Assim, os glicocorticoides promovem a rápida mobilização de aminoácidos e de ácidos graxos das reservas celulares, tornando-os imediatamente disponíveis para a síntese da glicose, necessária para fornecer energia aos diferentes tecidos do corpo nesta situação (CUNNINGHAM, 2004; GUYTON, 1997; BROWN, 1994). Os corticoides exercem também funções anti-inflamatórias, bloqueando os estágios iniciais do processo inflamatório pela promoção da estabilidade das membranas lisossômicas, assim como diminuindo a permeabilidade capilar e a migração de leucócitos para dentro da área inflamada pelo bloqueio da formação de prostaglandinas e leucotrienos, que deveriam aumentar a

vasodilatação (ROMERO e BUTLER, 2007). Promovem também a redução da fagocitose de células lesadas e da febre pela redução da liberação leucocitária de interleucina 1 (IL-1, um dos principais excitadores do centro termorregulador do hipotálamo). Além disso, o cortisol suprime o sistema imunitário, fazendo com que a proliferação linfocitária diminua acentuadamente, principalmente dos linfócitos T. Esta redução visa minimizar as reações do tecido inflamado, que poderiam promover um processo inflamatório adicional (CUNNINGHAM, 2004). A ação dos corticoides também aumenta a diurese, provavelmente por inibição da secreção de vasopressina (ADH ou HAD), e estimula a absorção de gordura pelo trato gastrointestinal, bem como a secreção ácida e de pepsina do estômago, sugerindo, assim, que o estresse contínuo possa contribuir para a formação de úlceras pépticas, tal como observado nos seres humanos (MOSTL; PALME, 2002; MATTERI, 2000).

Para que a reação ao estressor seja um evento fisiológico e positivo do organismo frente a uma adversidade, a homeostasia deverá retornar gradualmente. Deve, portanto, ocorrer um mecanismo de *Feedback* negativo (F-), também chamado de retroalimentação, no qual o excesso de glicocorticoides, liberados na circulação em uma situação de estresse, age sobre o hipotálamo, diminuindo a formação de CRH, e sobre a glândula hipófise, diminuindo a formação de ACTH. Quando o retorno à homeostasia não ocorre, o animal pode vir a sofrer prejuízos em sua saúde (MATTERI et al., 2000)

O animal que está sujeito a uma situação de estresse contínuo (crônico) pode, portanto, vir a desenvolver transtornos de diferentes naturezas, tais como distúrbios digestivos, cardíacos, reprodutivos e principalmente imunológicos, ficando, assim, predisposto a infecções virais, bacterianas e parasitárias pela supressão de sua imunidade. Além disso, existem alterações psicológicas e comportamentais que também podem ser causadas pelo estresse crônico (FOWLER, 1986; BEERDA et al., 1997).

3.3 Cortisol

O córtex da adrenal produz dois tipos principais de hormônios esteroides, denominados mineralocorticoides e glicocorticoides, que são hormônios com funções claramente diferentes. O cortisol é o glicocorticoide mais potente produzido pelo córtex adrenal e é responsável por aproximadamente 95% de toda a atividade glicocorticoide do organismo (CUNNINGHAM, 2004; ELIAS e CASTRO, 2005).

Os esteroides adrenais são moléculas de pequeno peso molecular (250-350 Da), sintetizados a partir do colesterol através de uma série de etapas mediadas enzimaticamente,

com estruturas químicas muito semelhantes, não são espécie-específicas, são resistentes ao calor e, portanto, estáveis à temperatura ambiente. As concentrações plasmáticas, da ordem de nanomoles ou micromoles por litro, não exigem ensaios muito sensíveis. Por outro lado, a semelhança estrutural dos esteroides exigem anticorpos altamente específicos ou a necessidade de extração e de cromatografia prévia (CASTRO; MOREIRA, 2003).

O cortisol é conhecido por estimular a gliconeogênese para garantir um suprimento adequado de substrato; aumentar a mobilização de ácidos graxos livres, tornando-os mais disponível como fonte energética; diminuir a utilização de glicose, poupando-a para o cérebro; estimular o catabolismo proteico para liberar aminoácidos para o uso na reparação, na síntese de enzimas e na produção de energia; atuar como um agente anti-inflamatório; e aumentar a vasoconstrição causada pela adrenalina (ELIAS; CASTRO, 2005).

O cortisol circula no sangue ligado às proteínas transportadoras, a transcortina, a principal proteína transportadora de corticóides (CBG), e a albumina. Do cortisol transportado no plasma, 75% estão ligados a transcortina e 15% com a albumina plasmática, permanecendo apenas uma pequena fração (5-10%) encontra-se na forma não-ligada ou forma livre, isto é, na fração biologicamente ativa do hormônio. A meia vida do cortisol é de 60 minutos (CUNNINGHAM, 2004).

A secreção diária de cortisol caracteriza-se pela atividade aumentada nas primeiras horas da manhã e inatividade nas últimas horas da noite, perfazendo um ritmo circadiano, que pode sofrer influência do sono, da alimentação, da escuridão, da luminosidade. Aumentos de ACTH e cortisol podem acontecer independentemente do ritmo circadiano, em resposta a estresse físico e psicológico (ELIAS; CASTRO, 2005). A magnitude da concentração matinal é afetada por fatores genéticos. A origem deste ritmo circadiano é o sistema nervoso central, no qual o ACTH também é liberado na forma de pulsos. O controle do "relógio metabólico" em mamíferos está localizado no núcleo supraquiasmático do hipotálamo (DARLINGTON et al., 1998).

A avaliação dos níveis circulantes de glicocorticoides, especialmente do cortisol em mamíferos, é útil no diagnóstico de distúrbios adrenocorticais e de estresse. A maioria dos métodos de imunoenaios utilizados na determinação do cortisol no plasma detecta o cortisol total (ligado e livre), ao passo que a dosagem do cortisol na urina e na saliva quantifica o cortisol livre. A medida precisa da concentração do cortisol total foi, inicialmente, realizada por técnicas de competição à ligação a proteínas usando anticorpos específicos. Este método foi substituído pelo radioimunoensaio (RIA) e, mais recentemente, por ensaios de imunofluorescência e quimioluminescência, ensaios estes de maior sensibilidade e

especificidade. A determinação do cortisol livre urinário e salivar, podem também ser realizada por imunoenaios ou cromatografia líquida de alta pressão (HPLC, *high performance liquid chromatography*) (CASTRO; MOREIRA, 2003).

O cortisol salivar representa a fração livre do cortisol e mostra boa correlação com o cortisol sérico total e excelente correlação com o cortisol sérico livre. O cortisol salivar é cerca de um terço mais baixo do que o cortisol sérico livre. Essa diferença se dá, provavelmente, devido à conversão parcial do cortisol em cortisona, secretada na saliva por difusão passiva a partir de células acinares das glândulas salivares (VINING et al., 1983; TUNN, 1992). As concentrações do cortisol na saliva são independentes do fluxo salivar e das flutuações da transcortina. Um aumento no cortisol sérico se reflete no cortisol salivar dentro de poucos minutos. Dessa forma, ao obter-se uma amostra de saliva em um período de dois a três minutos estará reproduzindo a concentração do cortisol sérico livre durante o mesmo período de tempo (RAFF, 2000). Concentrações muito altas de cortisol sérico trazem aumentos desproporcionais no cortisol salivar (TUNN, 1992).

As amostras de saliva são obtidas por procedimento simples, não invasivo, livre de estresse. Estas amostras podem ser coletadas muitas vezes ao dia, permitindo a avaliação dinâmica da secreção de cortisol livre. Além disso, as amostras do cortisol salivar são estáveis em temperatura ambiente por uma semana e podem ser transportadas ao laboratório pelo correio ou pelo portador, sem nenhuma perda da atividade do cortisol (CASTRO; MOREIRA, 2003).

3.4. Estresse e Reprodução

A resposta do eixo Hipotálamo-pituitária-Adrenal (HPA) em reação a um estressor pode interferir com a reprodução dos animais atrasando ou inibindo o eixo reprodutivo. Um efeito bem conhecido do estresse é o decréscimo na libido, na fertilidade, na implantação de óvulos fertilizados e no desenvolvimento fetal (SPRAKER, 1993).

Os hormônios liberados em resposta ao estresse alteram as funções reprodutivas através dos três níveis do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG): no hipotálamo (inibindo a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), na pituitária (interferindo, com o GnRH, na liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH) e nas gônadas (alterando o efeito estimulador das gonadotrofinas na secreção de esteroides sexuais) (TILBROOK et al., 2000). O hormônio liberador de corticotropina (CRH) tem sido considerado um mediador dos efeitos anti-reprodutivos provocados pelo estresse

através de sua produção no hipotálamo, inibindo a secreção do GnRH. O GnRH é um peptídeo chave que controla a secreção de gonadotrofinas, principalmente do LH e portanto a função gonadal, resultando em diminuição da produção de esteróides sexuais (MATTERI et al., 2000; TILBROOK et al., 2000).

O controle das funções sexuais tem início com a secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, que por sua vez, estimula outros dois hormônios provenientes da glândula hipófise anterior: a luteínica (LH) que é o estímulo primário para a secreção de testosterona pelos testículos e a folículo-estimulante (FSH), responsável pelo estímulo da espermatogênese. A quantidade de testosterona segregada, aumenta aproximadamente em proporção direta com a proporção de LH disponível, tendo a testosterona o efeito retroativo de parar a secreção de LH, acontecendo uma inibição mútua e um controle de *feedback* negativo da secreção de testosterona (BREEN; KARSCH, 2004).

Segundo Rivier e Rivest (1991) e Tilbrook et al., (2002) os glicocorticóides, liberados em resposta a estresse prolongado é a principal causa de redução da secreção de gonadotrofinas. O hormônio luteinizante (LH) no macho é essencial na produção de andrógenos (testosterona) nas células de *Leydig*, são estimuladores da espermatogênese. Um efeito supressor do estresse na liberação e/ou resposta de LH ou GnRH pode resultar em diminuição da espermatogênese e reduzir a capacidade reprodutiva (BREEN; KARSCH, 2004; SUNDQVIST et al., 1989).

O impacto do estresse sobre parâmetros espermáticos são exemplos mostrados em um estudo realizado por Almeida et al. (1998), quando ocorre uma tensão prolongada em ratos machos, causada através de repetidas imobilizações por um período de mais de 60 dias resultou na redução dos níveis de LH e testosterona, bem como uma redução na concentração de espermatozoides.

Problemas reprodutivos provocados por agentes estressantes foram relatados em saguis (*Callithrix jacchus*), que apresentaram significativa redução no volume de sêmen e na concentração espermática (CUI, 1996). Em felídeos cativos a insuficiência reprodutiva pode ser atribuída a uma diminuição da tolerância às condições do cativeiro, pois os corticosteroides excessivamente liberados nesta situação têm ação direta sobre os níveis circulantes de testosterona, devido a uma redução na concentração de receptores de LH nas células de *Leydig* (CARLSTEAD et al., 1993).

3.5. Bem estar e Comportamento animal

Bem-estar animal é um tema de crescente preocupação na maioria dos países do mundo e essa preocupação está resultando em mudanças nas formas em que os agricultores e outros usuários animais mantêm e tratam os animais (HARVERBEKE, 2008). Bem-estar pode ser definido de uma forma que incorpora ideias sobre as necessidades, sentimentos, estresse e saúde. A avaliação científica do bem-estar animal tem desenvolvido de forma substancial e muitos estudos com diferentes tipos de animais têm sido realizadas. Informações a partir de tais estudos são utilizadas pelos legisladores, empresas de alimentos e para o público, com a consequência de que os vários tipos de regulamentação conduzem a melhorias reais no bem-estar animal (DUNCAM, 2005; BROOM, 2007).

Embora não haja consenso universal sobre a definição ou medição do bem-estar, uma das formas mais reconhecidas para avaliar o bem-estar é baseado na definição de Broom (1986, pag. 524) "*O estado de um animal em relação às suas tentativas de se adaptar ao meio em que vive*". O enfrentamento às vezes pode ser conseguido com pouco esforço e dispêndio de recursos, caso em que o bem-estar do indivíduo é satisfatório, ou pode falhar para lidar com todos, caso em que o seu bem-estar, obviamente, é pobre. Para os animais domésticos, principalmente para os animais de companhia, esse é um conceito que muitas vezes pode ser confundido e mal aplicado pelo homem à medida que esse confronta a realidade do animal com a sua própria, passando a adequar parâmetros humanos a esses animais (RANDALL et al., 2008).

Para tentar mensurar o bem-estar animal, é necessário conhecer a biologia e fisiologia comportamental do animal em sua vida natural, adequando tais observações aos indicadores fisiológicos e etológicos de satisfação da espécie em questão (RANDALL et al., 2008; GONÇALVES et al., 2010; BROOM; FRASER, 2010). E, para tanto, pode-se empregar diversas medidas hormonais, comportamentais, de dor, patológicas, entre outras, caracterizando-as em sinais de altos e baixos graus de conforto (BROOM; FRASER, 2010).

Sinais de afecções são amplamente aceitos como indicadores de bem estar pobre, pois eles são uma manifestação do sofrimento atual do animal. Redução de saúde pode ser um reflexo do bem-estar comprometido; consequentemente, sinais clínicos de claudicação, lesões de pele e avaliação da função imune são os indicadores patológicos mais comumente usados (CARENZI; VERGA, 2009; PEDERSON, 1996). No entanto, a ausência de lesões e doenças não é prova suficiente de bem-estar animal elevado. Portanto, o estado pré-patológico do animal que inclui imunidade suprimida (aumentando a vulnerabilidade a doenças), reduzida

capacidade de se reproduzir e a interrupção do crescimento normal, tendem a sugerir que o animal já está sofrendo e esses fatores poderiam ser utilizados como indicadores de bem-estar pobre (MOBERG, 1996; PEDERSON, 1996; DUNCAN, 2005).

Os principais indicadores fisiológicos de bem-estar são os níveis de hormônios da hipófise e glândulas supra-renais e as mudanças induzidas em órgãos-alvo por esses hormônios, como taquicardia, pressão arterial, hiperglicemia, linfocitose e eosinopenia (MORMEDE et al., 2007). As vantagens de indicadores fisiológicos de bem-estar animal são de que suas medições utilizam métodos analíticos confiáveis que são menos invasivas para o animal. Os níveis de cortisol são um bom indicador do grau de estresse experimentado por um animal, mas ainda necessita de estudos consistentes. Os métodos utilizados como indicadores de bem-estar não deve ser generalizada a todas as espécies, mas sim considerado dentro da espécie, e a busca de métodos mais confiáveis devem ser intensificados. Demonstrou-se que a frequência cardíaca, a função adrenal, bioquímica do cérebro, as respostas reguladoras e a supressão das funções são as principais respostas fisiológicas aos problemas de bem-estar a curto prazo (LINDBERG, 1995).

O comportamento é um importante indicador de bem-estar animal, no entanto, a principal dificuldade é a compreensão do comportamento normal, natural ou ideal do animal, a fim de quantificar o comportamento anormal. Indicadores de comportamento de baixo bem-estar incluem a incapacidade do animal para realizar um comportamento normal e a exposição de uma ação indesejável persistente por uma minoria da população que poderia ser denominado como um comportamento anormal (MWANGI et al., 2013). Comportamento anormal dos animais é classificado em cinco categorias que incluem: comportamento prejudicial que provoque lesões, simulações que são realizados na ausência de substrato adequado ou estímulos ambientais, comportamento apático em resposta a estímulos externos, comportamento de fuga que se manifesta como um desejo de deixar o ambiente confinado e comportamento redirecionado ou estereotipado. Comportamento anormal é prejudicial aos animais, é um sinal de que um animal tem problemas de adaptação ao seu ambiente, pode ser uma expressão do nível de desconforto que o animal está experimentando (DUNCAN, 2005).

O estudo do comportamento animal tem demonstrado a influência do comportamento e da organização social sobre os processos fisiológicos e celulares. Variações no ambiente social podem inibir ou estimular aspectos metabólicos. A qualidade do ambiente social e comportamental tem efeito direto sobre o funcionamento de outros sistemas orgânicos como temperatura corporal, pressão arterial e sistema imunológico (SNOWDON, 1999).

Conhecer a etologia canina irá permitir uma melhor utilização do animal, respeitando

seus limites e possibilitando a manutenção física e mental dentro dos padrões de bem-estar da espécie, bem como auxiliar as manipulações e cruzamentos artificiais feitos em busca de um animal com grau de excelência para determinadas características (DAWKINS, 1989; DARWIN, 2004, BISPO e PEREIRA, 1994).

Existe uma variação individual considerável nos comportamentos exibidos pelos cães alojados em condições semelhantes, sugerindo que os cães percebem os estressores de forma diferente dentro do canil, respondem de forma diferente aos mesmos fatores estressantes, ou possivelmente ambos, enquanto alguns cães parecem ser relativamente pouco afetados quando alojados em canis, outros parecem mostrar sinais comportamentais de mal-estar (HUBRECHT, 1995). A variabilidade em alterações comportamentais observados entre os indivíduos podem ser indicativos de diferentes estilos de enfrentamento de cães em resposta ao confinamento. Predisposição genética de um indivíduo, experiência de vida, particularmente quando jovens, todos contribuem para uma melhor adaptação do animal. O temperamento influencia a capacidade do indivíduo para lidar com o estresse, esses fatores podem influenciar a forma como o cão reage no ambiente do canil (HENNESSY et al., 1998; STEPHEN; LEDGER, 2005)

Os comportamentos que indicam condições de bem estar incluem uma postura relaxada, combinada com comportamentos de repouso, interações positivas com os outros cães e interesse no ambiente. Sinais visuais, tais como posturas corporais e expressões faciais, fornecem uma indicação do estado emocional de um cão. Eles também podem fornecer informações sobre a ação pretendida pelo cão em resposta a uma situação ou interação com seres humanos (HAUG, 2004; TAYLOR; MILLS, 2007).

Quando o animal experimenta condições de mal estar pode inicialmente apresentar comportamentos como apatia, juntamente com sinais de frustração, tremor, aumento da produção de saliva, piloereção, piscar os olhos, lambe o focinho com muita frequência, bocejar e ficar ofegante, são sinais de que um animal está lutando para lidar com o tipo de ambiente. Indicadores comportamentais associados com estresse agudo incluem baixa postura corporal, comportamentos orais excessivos e aumento da inquietação (BEERDA et al., 1999, SHILDER, 1992.), outros comportamentos observados incluem movimentos repetitivos, como saltando na parede, perseguição da cauda e sucção do flanco (HUBRECHT, 1992). Animais que sofrem de estresse crônico, podem exibir comportamentos tais como elevação constante da pata, vocalização excessiva, comportamentos repetitivo, manipulações do ambiente e coprofagia (BEERDA et al., 1999; HUBRECHT, 1992). É importante que os comportamentos que indiquem mal-estar sejam monitorados, pois podem ser transitórios,

quando sua exibição se torna prolongada ao longo do dia na ausência de estímulos, deve ser motivo de preocupação (TAYLOR; MILLS, 2007).

3.6. Cães e a atividade policial

A parceria homem e cão para o trabalho é mais antiga que a própria história cristã, não se tem notícia do momento histórico exato da domesticação dos cães para serem aplicados em tarefas. O tempo fez com que os cães chegassem ao trabalho policial e a evolução das doutrinas pertinentes, fez com que, as forças policiais evoluíssem a forma de aplicação do cão policial. O cão selecionado é utilizado como um meio de emprego de força e/ou instrumento de menor potencial ofensivo (ROLAK; ROBERT, 2000; GORDON, 2003).

A força policial européia usava sabujos (cães farejadores) já no século XVIII. E a partir da Primeira Grande Guerra, países como Bélgica e Alemanha formalizaram o processo de treinamento e começaram a usar os cães para tarefas específicas, como emprego de cães de guarda. A prática continuou até a Segunda Guerra Mundial. Os soldados retornavam para casa trazendo notícias de que cães bem treinados estavam sendo usados pelos dois lados do combate (LEMISH, 1999). Logo, os programas de cão policial foram iniciados em Londres e outras cidades européias. Nos Estados Unidos a partir dos anos setenta começa-se a desenvolver técnicas para a atividade de polícia com cães. Atualmente, os cães policiais são reconhecidos como parte vital da força da lei e seu uso tem crescido rapidamente (ROLAK; ROBERT, 2000).

No Brasil, os cães que desenvolvem trabalhos na área da Segurança Pública são equipamentos veiculados à Polícia Militar, Polícia Civil, Corpos de Bombeiros e Guardas Municipais e representam uma resposta a situações que envolvem entorpecentes, artefatos explosivos e salvamento de humanos, possuindo, ao mesmo tempo, um caráter preventivo e de enfrentamento (Normas Técnicas de Padronização para Canis de Segurança Pública, 2011). O primeiro canil para o uso da Segurança Pública foi inaugurado pela Polícia Militar do Estado de São Paulo, em 9 setembro de 1950. Atualmente, todas as Unidades Federativas possuem canis ou projetos de canis em pelo menos uma das instituições de segurança pública, ou tem postos avançados com o binômio cão *versus* cinotécnico com formação na própria unidade ou cedidas por outras (Normas Técnicas de Padronização para Canis de Segurança Pública, 2011).

Os cães podem ser empregados nas seguintes atividades: Policiamento ostensivo; Operações de busca, resgate e salvamento; Demonstrações de cunho educacional/ recreativo; Policiamento em praças desportivas; Controle de distúrbios civis; Contra-guerrilha rural e urbana; Provas oficiais de trabalho e estrutura; Controle de rebeliões e/ou fuga de presos; Formaturas e desfiles de caráter cívico-militar; e Detecção de entorpecentes (Normas Técnicas de Padronização para Canis de Segurança Pública, 2011).

Os animais geralmente iniciam as atividades em um canil de polícia com seis meses de idade, sendo designado a um policial, que será responsável por seu cuidado, adestramento, treinamento e, mais tarde, quando preparados, são utilizados no policiamento. Os cães são utilizados no serviço policial por tempo determinado aproximadamente entre quatro a seis, ou se ausentam por inservibilidade (quando o bem por alguma lesão permanente não possa ser mais utilizado para atividade fim), atestada por comissão examinadora. A grande maioria dos cães, após aposentadoria, é adotado pelo policial que o treinou ou é realizada a doação para pessoas interessadas (Instrução Normativa I – 19 PM, 1988).

A iniciação do cão ocorre com um adestramento básico de obediência para que saibam responder a comandos que serão essenciais no futuro, além do estabelecimento de regras e horários. Os treinamentos de ataque, perseguição, farejamento e resgate têm todos a mesma estrutura: quando o cão atinge objetivo esperado para a atividade ele é recompensado depois com o objeto do qual gosta de brincar. Os cães farejadores são treinados para reconhecer as substâncias e identificá-las por meio de muito treinamento e reforço positivo, assim como os cães de aplicação da ordem treinam repetidas vezes a manobra e exercícios de obediência, pois no momento da imobilização de algum suspeito eles tem sua agressividade inflamada e precisam responder bem aos comandos do adestrador (Instrução Normativa I – 19 PM, 1988).

Antes de ser reconhecido como um cão policial, ele passa por um período de teste para ver como reage e se comporta nas situações para as quais foi treinado, pois, o mesmo cão que está na linha de frente e perseguirá um infrator da lei, deve poder ser acariciado por uma criança e entender que seu papel é responder aos comandos de seu parceiro. Para que isto ocorra, nas horas de descanso os animais participam de projetos sociais apoiados pela polícia, que visam justamente a aproximação de comunidades com a força policial (Instrução Normativa I – 19 PM, 1988).

4. Material e Métodos

4.1. Animais

O experimento foi realizado nas dependências do Canil do 1º Batalhão de Ações Especiais de Policiamento (BAEP) da Polícia Militar, localizado no município de Campinas/SP. Foram utilizados oito cães (*canis lupus familiaris*) machos das raças Pastor Alemão, Pastor Belga Malinois, Rotwailer e Dobermann com média de idade de 4 anos e peso médio de 40 kg (Quadro 1).

Quadro 1. Identificação animal X raça envolvidos no trabalho.

Nome	Raça
Pegus	Pastor Alemão
Kelvin	Pastor Alemão
Thor	Rotwailer
Egar	Rotwailer
Connors	Dobermann
Lotan	Dobermann
Falcon	Pastor Belga Malinois
Gringo	Pastor Belga Malinois

Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

Os animais estavam alojados em boxes individuais construídos em alvenaria (dimensões – largura 2m, comprimento 4m, altura 2,10 m), possuindo uma área coberta de 3m² e um solário de 5m². As baias possuem bebedouro com água encanada e comedouro de metal, esgoto canalizado, tablado de madeira (2,25 m²), porta com visores e tranca de segurança, piso em cimento com caimento gradual na direção do escoador (ralo sifonado), iluminação elétrica e paredes revestidas (Figura 1).

Conforme o decreto 40400/95 o compartimento (boxe) destinado ao abrigo de cães deve ser individual, construído em alvenaria, com área compatível com o tamanho dos animais que abriga e nunca inferior a 1,00m²; as paredes devem ser lisas, impermeabilizadas de altura nunca inferior a 1,5m; o escoamento das águas servidas não poderá comunicar-se diretamente com outro canil; pode ser adotado o canil tipo solário, com área mínima de 2,00m², sendo o solário totalmente cercado por tela de arame resistente, inclusive por cima.

Os cães recebem ração comercial *Premium* uma vez ao dia no período da tarde, de modo a suprir os requerimentos nutricionais preconizados pelo *National Research Council*, e água *ad libitum*. Os cães são vacinados e vermifugados regularmente conforme o protocolo

utilizado pelo Canil, além de serem realizados exames clínicos (exame físico completo) e laboratoriais (avaliações de sangue e urina) rotineiramente.

Figura 1. Fotos ilustrativas do canil do 1º Batalhão de Ações Especiais de Policiamento (BAEP) da Polícia Militar, Campinas/SP. Em **A** destacamos a área de disposição de todos os boxes, em **B e C** o canil e em **D e E** elucidamos as instalações do canil solário e área coberta.



Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

Cada animal tem um adestrador – policial que cuida do animal nos dias em que estiver de serviço; quando o adestrador estiver de folga o animal fica em seu boxe tendo apenas como cuidados a alimentação, troca da água e limpeza do canil. Os animais do canil da polícia militar tem uma rotina de trabalho e treinamento totais de 12 horas, o qual inicia-se às 6h00 com o treinamento militar e termina por volta das 10h00 com pausa para o repouso; a rotina de trabalho recomeça às 13h00 e finaliza por volta das 18h00 concludido o treinamento os cães retornam aos boxes para descanso. Após esse dia de treinamento e trabalho os animais tem um descanso de 36 horas, retornando depois deste período geralmente com as mesmas

atividades.

O treinamento militar consiste de uma rotina diária de exercícios de obediência básica, exercícios de adestramento militar, condicionamento físico e faro (drogas, pessoas e armas). O trabalho militar engloba o policiamento de rua em que o cão integra uma viatura policial e são empenhados em ocorrências com entorpecentes, localização de indivíduos criminosos e armas. Participam de eventos futebolísticos, onde ficam ao redor do campo na guarda de jogadores, árbitros e outros presentes, com o intuito de proteger possíveis agressores que adentrem o local.

4.2. Metodologia

O desenvolvimento do trabalho foi realizado ao longo de 60 dias, e neste período realizamos por 7 dias a adaptação dos animais para as coletas. Seguidamente as coletas de cortisol salivar, observação comportamental e coleta e avaliação do sêmen foram realizadas, durante seis dias consecutivos, não ocorrendo intervalo entre as coletas, conforme descrito posteriormente.

Para a análise dos dados e coleta do material, os animais foram divididos em dois períodos:

- período trabalho (PT): animais em dias de treinamento e trabalho;

- período controle (PC): animais em dias de folga sem treinamento ou trabalho.

No período de trabalho (PT) as atividades de treinamento realizadas foram de faro e exercícios de obediência que ocorria pela manhã, e à tarde foram empregados em ocorrências de localização de entorpecentes. No período controle (PC) os animais permaneciam nos boxes apenas com cuidados de alimentação e limpeza do ambiente.

4.2.1 Protocolo de Coleta de cortisol

A análise do cortisol foi efetuada através da coleta da saliva, utilizando-se o tubo Salivette® (marca SARSTEDT Ref 51.1534.500), constituído por um tubo plástico que contém um rolo de algodão de alta absorção. A cavidade oral dos animais foi previamente limpa com água filtrada e seguidamente os cães mastigaram o tubo coletor por um período de três a cinco minutos (Figura 2). As amostras de saliva foram centrifugadas a 2000rpm por cinco minutos e o sobrenadante separado e estocado a -20°C. Ao findar os procedimentos de colheita de saliva, todas as amostras foram encaminhadas ao DAC Laboratório de Análises Clínicas de Pirassununga/SP, onde se dosou o hormônio cortisol por meio de eletroquimioluminescência.

Figura 2. Fotografias ilustrativas destacando o tubo para coleta e um cão como demonstrado o procedimento.



Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

A colheita de amostras do PT foi realizada quatro vezes ao dia, durante três dias, (Quadro 2), o qual foi analisado da seguinte maneira: T0 antes do treinamento, T1 após treinamento, T2 antes do trabalho, depois de um período de repouso e Tf final da rotina diária. As análises do PC basearam-se em duas coletas diárias de amostra, durante três dias (Quadro 3).

Quadro 2. Descrição das coletas diárias de cortisol salivar no período trabalho (PT). I - TR: 1ª coleta de trabalho, II- TR: 2ª coleta de trabalho e III - TR: 3ª coleta de trabalho.

Nome do animal			
Horário	I – TR	II – TR	III – TR
T0 - 07:00 (antes treino)			
T1 - 10:00 (depois treino)			
T2 - 13:00 (antes trabalho)			
T3 - 18:00 (depois trabalho)			

Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

Quadro 3. Descrição das coletas diárias de cortisol salivar no período controle (PC). I - FG: 1ª coleta de folga, II- FG: 2ª coleta de folga e III - FG: 3ª coleta de folga .

Nome do animal			
Horário	I – FG	II – FG	III – FG
T0 - 07:00			
T1 - 18:00			

Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

Essa metodologia teve como pretensão minimizar o estresse antecipado e/ou imediato, como pode ocorrer em métodos mais invasivos; os animais foram adaptados com a presença do pesquisador para que fosse feita as coletas, evitando estresse de manejo e qualquer alteração no resultado final das amostras.

4.3. Parâmetros Reprodutivos

Os parâmetros reprodutivos foram analisados através de consistência testicular e análise do sêmen.

4.3.1 Consistência Testicular

A consistência testicular foi mensurada por meio de palpação sempre pelo mesmo técnico. Utilizando-se uma escala de um a cinco para classificação, onde: 1- consistência friável; 2- consistência intermediária; 3- consistência firme (desejável); 4- consistência túrgida e, 5- consistência dura.

4.3.2 Análise do Ejaculado

Foram executadas duas coletas no período de 60 dias, período que o experimento foi realizado, utilizando apenas a segunda coleta para avaliação, devido os animais estarem em repouso reprodutivo. Para análise do sêmen, a coleta foi realizada em ambiente tranquilo, pelo método da estimulação digital (mão enluvada), utilizando um funil devidamente limpo, adaptado a tubo coletor cônico de 15 mL (Figura 3). Anteriormente a colheita, o pênis foi higienizado com uma gaze ou compressa seca, para evitar contaminação das amostras e os primeiros jatos do ejaculado foram descartados, sendo a segunda e terceira frações espermáticas colhidas juntas.

Figura 3. Foto ilustrativa do funil de vidro e tubo coletor cônico de 15ml utilizado na coleta de sêmen.



Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

Imediatamente após a colheita, o ejaculado foi mantido em banho-maria a temperatura de 37° C e avaliado volume, odor e pH. O volume foi avaliado pela leitura direta da graduação do tubo coletor e para a avaliação do pH utilizamos fitas medidoras da marca Merck® com variação de 0 a 14, sendo 0 a 6 (ácido) e 7 a 14 (básico ou alcalino).

A análise de motilidade espermática com movimento progressivo foi feita utilizando-se uma gota de sêmen fresco colocada entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C, e observada em microscópio de contraste de fase, em aumento de 100X. O vigor foi analisado nessa mesma amostra, durante a visualização da motilidade, quanto a intensidade do movimento progressivo dos espermatozoides, pelo escore de 0 (nenhum movimento) a 5 (movimento retilíneo) (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A determinação da concentração espermática (número de espermatozoides/ mL) foi realizada através da diluição do sêmen em 1:20, sendo 50 µL de ejaculado e 950 µL de água destilada ou formol salina tamponado a 10%. Essa diluição foi utilizada para preencher a câmara hematocitométrica de “Neubauer”. Após sedimentação das células espermáticas, foi realizado a leitura em microscópio de contraste de fase, com aumento de 100X, e o número de células contadas e expressas em espermatozoides por mL (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Para a análise da morfologia espermática foram realizados esfregaços confeccionados com o sêmen, em lâmina de vidro, fixados em formol salina durante 10 minutos em banho-maria a 37°C, secos em temperatura ambiente e armazenados. Posteriormente, as lâminas foram coradas pelo método de Karras modificado (PAPA et al., 1988) e contadas 200 células,

em microscópio, com objetiva de imersão (100X). As alterações morfológicas foram classificadas em defeitos maiores e menores. Realizou-se a contagem diferencial de 200 células em microscópio de contraste de fase, com objetiva de imersão (100X) e foram divididos em:

- **Defeitos maiores:** Acrossomo; Patologia de cabeça (subdesenvolvida, isolada patológica, estreita na base, piriforme, pequena anormal, contorno anormal, “Pouch formation” e “knobbed”); Gota citoplasmática proximal; Formas teratológicas; Defeitos de peça intermediária; Patologia de cauda (fortemente dobrada, dobrada com gota e enrolada na cabeça) e Formas duplas (HAFEZ e HAFEZ, 2004);

- **Defeitos menores:** Patologia da cabeça (delgada, gigante, curta, larga, pequena normal e isolada normal); Patologia da cauda e implantação (retro e abaxial, oblíquo, dobrada ou enrolada) e Gota citoplasmática distal (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O ejaculado normal deve apresentar cor branca e aspecto leitoso, com Ph que varia de 6,0 a 6,6. O volume varia de acordo com a fração: primeira fração tem um volume variável, mas geralmente é de 0,5 ml, a segunda fração varia de 0,5 – 1ml, em alguns cães podendo chegar até a 3 ml e a última fração a que possui maior volume e pode variar de 3 a 30 ml. A motilidade oscila entre 80-90 % e abaixo de 60% pode ser considerada como anormal. O vigor não deve ser inferior a 3,5. As alterações morfológicas localizam-se com maior frequência na cabeça e na cauda, um ejaculado normal apresenta de 13 a 15% de alterações morfológicas totais. A concentração espermática fica em torno de $247 - 9,9 \times 10^6$ espermatozoides/ml (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

4.4. Avaliação Comportamental

Para a análise comportamental os animais foram observados ao longo de seis dias, as observações foram conduzidas pelo método de observação direta, sendo realizada individualmente com o animal dentro do boxe e registrados na planilha em termos de ocorrência e duração do comportamento. As observações foram feitas duas vezes ao dia, no período da manhã entre 6:00 e 8:00, e período da tarde entre 16:00 e 18:00, com duração de cinco minutos para cada cão dentro período observado, somados todos os períodos observados (duas vezes ao dia) ao longo dos 6 dias, totaliza-se o tempo de 60 minutos para cada animal.

Antes de cada período de observação, foi permitido aos animais 10 minutos para

habituaem-se à presença do observador, e o local escolhido para os registros, permitia pouca visualização do observador pelos animais, deixando-o pouco aparente, evitando assim que sua presença interferisse nos comportamentos.

Durante o período do estudo, os registros do comportamento foram realizados apenas por um observador. Anteriormente ao início do experimento, o observador foi treinado coletando dados simultaneamente dos animais, ao término das sessões de treinamento, os resultados eram utilizados para obter uma padronização dos critérios para o reconhecimento e a tabulação dos diferentes aspectos comportamentais, utilizando como referência o trabalho de Harverbeke et al., (2008).

As categorias comportamentais que foram consideradas para registro estão descritas no quadro 4.

Quadro 4. Comportamentos observados nos animais.

COMPORTAMENTO REPETITIVO e ESTEROTIPADO		
E1	Andamento	Repetir imediatamente um caminho acabado de tomar e continuando na repetição; em círculos, em uma figura em forma de oito ou andar em linha na cerca /muro
E2	Circulando	Caminhada contínua em círculos curtos, aparentemente correndo atrás do rabo ou patas traseiras.
E3	Manipulação Ambiente	Interações estereotipadas com elementos do ambiente; cavando (riscar o chão com as patas dianteiras de uma forma que é semelhante quando os cães estão cavando buracos); lambendo chão (lambero chão com a língua); esfregando as pernas contra grades, roendo grades ou outros materiais do ambiente.
COMPORTAMENTO REPOUSO		
R1	Deitado/cabeça para cima	Tronco do corpo no chão do boxe.
R2	Sentado	Posteriores e patas dianteiras apenas em contato com o chão do boxe.
R3	Sentado Cabeça na grade	Posteriores e patas dianteiras apenas em contato com chão do boxe, com sua cabeça encostada na grade de proteção.
R4	Estar em pé	Ereto com quatro patas em contato com chão do boxe.
R5	Comportamentos orais	Latidos, rugido, uivar, outros.
R6	Deitado/ cabeça para baixo	Tronco do corpo e cabeça no chão do boxe.
COMPORTAMENTO MOVIMENTO		
M1	Andar	Leva pelo menos um passo, mudando a posição do corpo.
M2	Farejar	Nariz movido ao longo dos objetos e / ou claro movimentos de farejar são exibidos.
M3	Urinar	Urinar ao levantar um dos membros posteriores
M4	Defecar	Excretar o conteúdo intestinal.
M5	Beber água	Ingerir água do bebedouro.
M6	Comportamentos orais	Latir, rugido, uivar, outros.
M7	Comer	Ingerir alimento do comedouro

Fonte: Adaptada de Harverbeke et al., (2008).

4.5. Avaliação Estatística

Para a obtenção dos dados de cortisol realizamos a análise da variância (MIXED-SAS), para comparação dos Períodos de trabalho e controle foram incluídos efeitos fixos de raça, hora (7 e 18 horas) e suas interações. Para avaliação somente do período trabalho incluímos efeitos fixos de raça, hora (7, 10, 13 e 18) e suas interações. As médias foram comparadas pelo teste F e teste T ou teste de Tukey (PDIFF) quando cabível.

A obtenção dos dados de comportamento deu-se através de análises exploratórias com

o propósito de caracterizar a forma de distribuição dos dados e as fontes de variação mais relevantes, sendo que a partir destes resultados utilizou-se o modelo ajustado a teoria de modelos lineares generalizados, utilizando-se o procedimento GLIMMIX do software SAS. Para avaliação de cada variável comportamental, a partir das porcentagens das frequências de ocorrências das diferentes variáveis categóricas relacionadas ao etograma de trabalho, realizou-se a transformação de escala dos dados para “arco-seno raiz de porcentagem”, procedendo-se à análise de variância.

O modelo estatístico contemplou os efeitos de raça, período (manhã e tarde), escala (controle e trabalho) e suas interações, e o procedimento para comparações múltiplas (PDIFF) com os transformados. Para apresentação dos resultados os dados foram retornados à escala original. Para todos os procedimentos foi adotado 5% de significância.

5. Resultados

5.1 Análise Comportamental

A análise comportamental dos Períodos trabalho e controle foi realizada no período da manhã e tarde, totalizando 60 minutos para cada animal.

As análises dos comportamentos de Repouso demonstraram que estes apresentaram maior duração. O comportamento R1 (deitado) o mais observado, não diferiu entre as raças, o comportamento R2 (sentado) e R3 (sentado com a cabeça na grade do boxe) foram mais elevados na raça Pastor Alemão, o comportamento R4 (estar em pé) foi observado por mais tempo nas raças Belga de Malinois e Rotwailer. A raça Pastor Alemão foi a que permaneceu mais tempo com comportamentos orais (R5), as demais raças não tiveram diferença significativa. O comportamento R6 (estar de pé com duas patas ao solo) foi mais observado nas raças Pastor Alemão e Dobermann, pouco ou não observado nas outras.

Quanto aos comportamentos em movimento (M), o mais observado foi o andar (M1), nas Raças Rotwailer e Belga Malinois comparada às raças Pastor Alemão e Dobermann, enquanto que os comportamentos M2 (farejar), M4 (defecar), M5 (beber água), M6 (comportamentos orais) e M7 (comer), foram poucos observados e não diferiram significativamente entre as raças e o comportamento M3 (urinar) não foi observado no período (Tabela 1, figura 4).

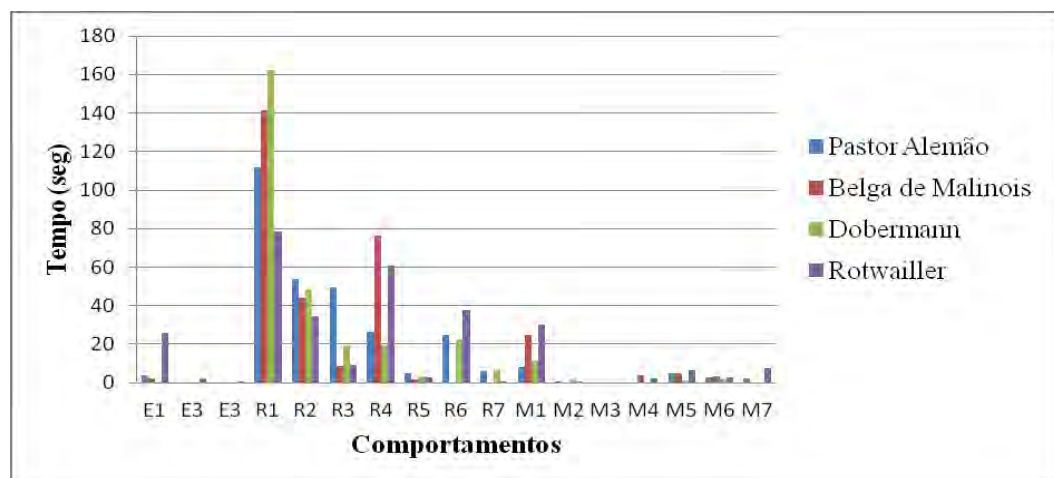
Analisando todos os comportamentos por raça, observamos que a raça Rotwailer apresentou maior tempo de comportamentos estereotipados em relação aos demais comportamentos analisados. As raças Pastor Alemão e Belga Malinois apresentaram poucos momentos relacionados com a estereotipia e na raça Dobermann não observamos este comportamento.

Tabela 1. Média dos tempos em segundos observados para cada comportamento, independente do período de atividade. As letras indicam as diferenças de cada comportamento em relação à raça. O sinal asterisco (*) indica diferença estatística, valor de $p < 0,05$.

		Raças			
Comportamento		Pastor Alemão	Belga Malinois	Dobermann	Rotwailer
E1	Andar repetitivo	3,95 b	2,45 b	0 c	26 a
E2	Circulando	0 b	0 b	0 b	2,3 a
E3	Manipulando Ambiente	0 b	0 b	0 b	0,541 a
R1	Deitado cabeça cima	111,75 a	141,21 a	162,42 a	78,29 a
R2	Sentado	54 a	44,08 b	48,41 b	34,37 b
R3	Sentado cabeça na grade	49,29 a	8,75 b	19,67 a	9,41 b
R4	Estar em pé	26,67 b	76,34 a	19,42 b	60,79 a
R5	Comp. orais repouso	4,67 a	1,7 b	3,4 b	2,5 b
R6	Deitado cabeça no chão	25 a	0 b	22 a	37,5 a
R7	Estar em pé 2 patas solo	5,87 a	0 c	6,84 a	0,34 b
M1	Andar	8,291 b	25,04 a	11,62 b	30,2 a
M2	Farejar	0,625 a	0 b	1,54 a	0,2 a
M3	Urinar	0	0	0	0
M4	Defecar	0 b	3,62 a	0 b	2,29 a
M5	Beber água	4,75 a	4,84 a	1,29 b	6,45 a
M6	Comp Orais movimento	2,87 a	3,34 a	1,71 a	2,62 a
M7	Comer	2,25 b	0 c	0 c	7,79 a

Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

Figura 4. Gráfico elucidando a média dos tempos (segundos) observados para cada comportamento nas diferentes raças independente do período de atividade.



Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

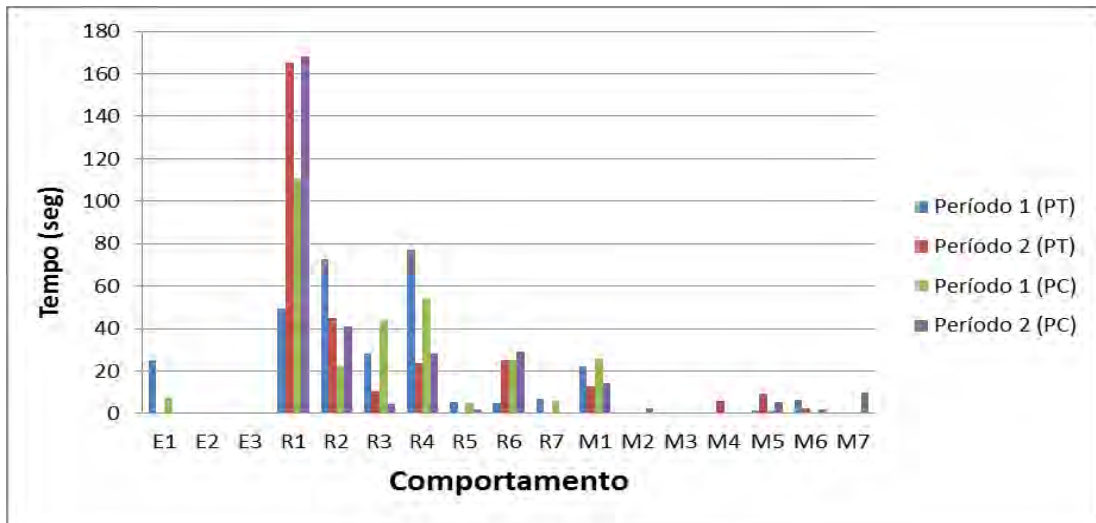
Ao analisarmos o comportamento e sua interação no Período Trabalho e Controle com o período da coleta (Período 1 = 07h00 e Período 2 = 18h00), observamos que o comportamento estereotipado (E1, E2 e E3) foi mais elevado no período 1 em ambos os períodos, não sendo observado no período 2. O comportamento em repouso deitado (R1) foi maior no 2º período em ambos os períodos, porém não houve diferença estatística significativa, enquanto que o período 1 foi significativamente maior no Períodos Controle (Tabela 2 e figuras 5).

Tabela 2. Média dos tempos observados para cada comportamento e sua interação no período controle e período Trabalho com o período de observação (manhã ou tarde). As letras indicam as diferenças de cada comportamento em relação ao período de trabalho ou controle e período de observação. O sinal asterisco (*) indica diferença estatística, valor de $p < 0,05$.

Comportamento	Período Trabalho (PT)		Período Controle (PC)	
	Período 1	Período 2	Período 1	Período 2
E1 Andar repetitivo	25,2 a	0 b	7,2 b	0 b
E2 Circulando	0 b	0 b	0,54 a	0 b
E3 Manipulando Ambiente	0 b	0 b	0,54 a	0 b
R1 Deitado cabeça cima	49,37 c	165,42 a	110,75 b	168,13 a
R2 Sentado	72,84 a	44,91 b	22,04 b	41,08 b
R3 Sentado cabeça na grade	28 b	10,5 c	44 a	4,62 c
R4 Estar em pé	77,08 a	23,87 c	54,29 b	27,97 c
R5 Comp. orais repouso	5,2 a	0 c	5 a	2,08 b
R6 Deitado cabeça no chão	5,17 b	25 a	25 a	29,34 a
R7 Estar em pé 2 patas solo	7,17 a	0 b	5,87 b	0 b
M1 Andar	22,34 a	12,7 b	25,75 a	14,37 b
M2 Farejar	0 b	0 b	0 b	2,37 a
M3 Urinar	0	0	0	0
M4 Defecar	0 b	5,91 a	0 b	0 b
M5 Beber água	1,41 c	9,17 a	1,37 c	5,37 b
M6 Comp Oraís movimento	6,5 a	2,25 b	0 d	1,79 c
M7 Comer	0 b	0 b	0 b	10,04 a

Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

Figura 5. Média dos comportamentos observados no Período Controle e Trabalho durante o Período 1 (07h00) e o período 2 (18h00).

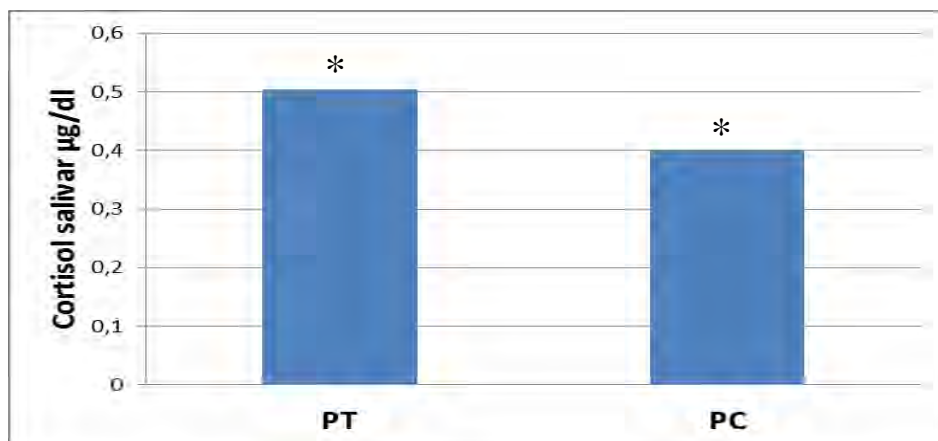


Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

5.2 Análise do Cortisol

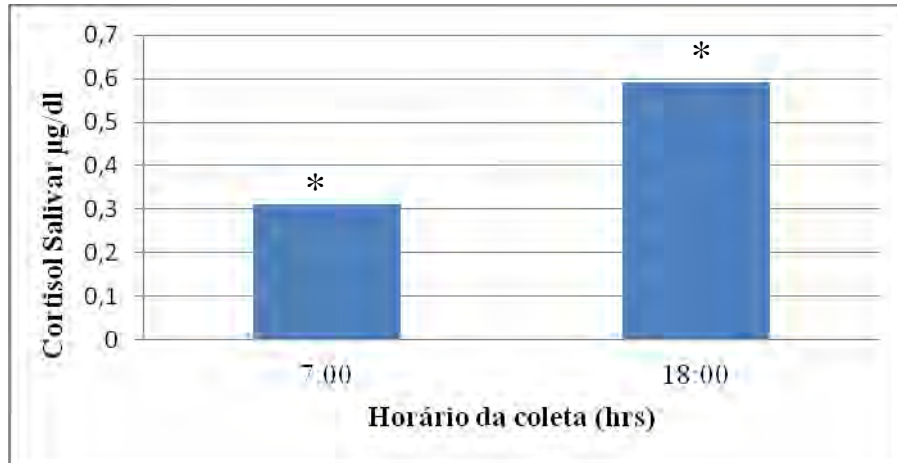
Nossos resultados destacam que a média dos níveis de cortisol salivar apresentados pelo Período trabalho foram de $0,504\mu\text{g}/\text{dl}$, significativamente maior que a média das dosagens encontradas no Período controle de $0,4\mu\text{g}/\text{dl}$ (Figura 6) e demonstraram diferenças significativas entre os níveis de cortisol medidos nos diferentes períodos, sendo o período das 18h00 com maior média $0,592\mu\text{g}/\text{dl}$ quando comparado como período das 07h00 com média de $0,312\mu\text{g}/\text{dl}$ ($p = 0,0234$) (Figura 7).

Figura 6. Médias dos valores de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) coletados nos Períodos de Trabalho e Folga.



Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

Figura 7. Médias dos valores de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) coletados às 07:00 e às 18:00, para os dois Períodos (Trabalho e Controle).



Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

Avaliando os níveis de cortisol nas diferentes raças encontramos diferenças significativamente maiores ($p > 0,05$) nas raças Rotwailer com média de $0,614 \mu\text{g}/\text{dl}$ e Pastor Alemão com média de $0,567 \mu\text{g}/\text{dl}$, comparadas às raças Belga de Malinois ($0,331 \mu\text{g}/\text{dl}$) e Dobermann com média de $0,297 \mu\text{g}/\text{dl}$ (Tabela 3 e figura 8).

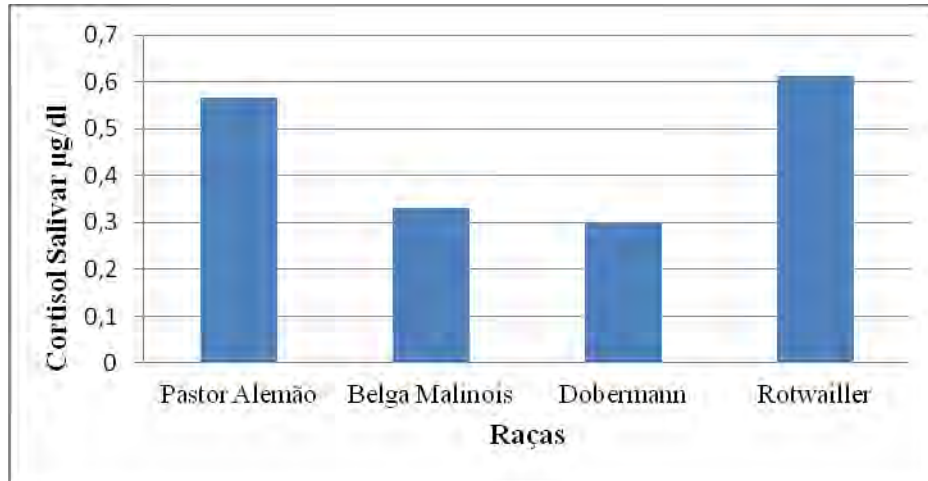
Tabela 3. Concentração de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) nas diferentes raças (considerando os horários 07:00 e 18:00).

Característica da amostra - Raça	Média	Desvio Padrão
Pastor Alemão	0,567 A	0,120
Belga Malinois	0,331 B	0,120
Dobermann	0,297 B	0,120
Rotwailer	0,614 A	0,120

Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

As letras indicam que são diferentes, $p < 0,05$.

Figura 8. Comparação entre as médias dos valores de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) nas diferentes raças, coletados às 07h00 e 18h00.



Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

A análise dos níveis de cortisol salivar somente no Período trabalho ressaltou que, a raça Pastor Alemão apresentou o valor médio mais elevado (média = $0,582\mu\text{g}/\text{dl}$), seguida da raça Rotwailer (média = $0,496\mu\text{g}/\text{dl}$), este resultado foi destacado quando comparamos as médias da raça Dobermann (média = $0,242\mu\text{g}/\text{dl}$) e Belga Malinois (média = $0,323\mu\text{g}/\text{dl}$), valor de $p < 0,05$ (Tabela 4 e figura 9).

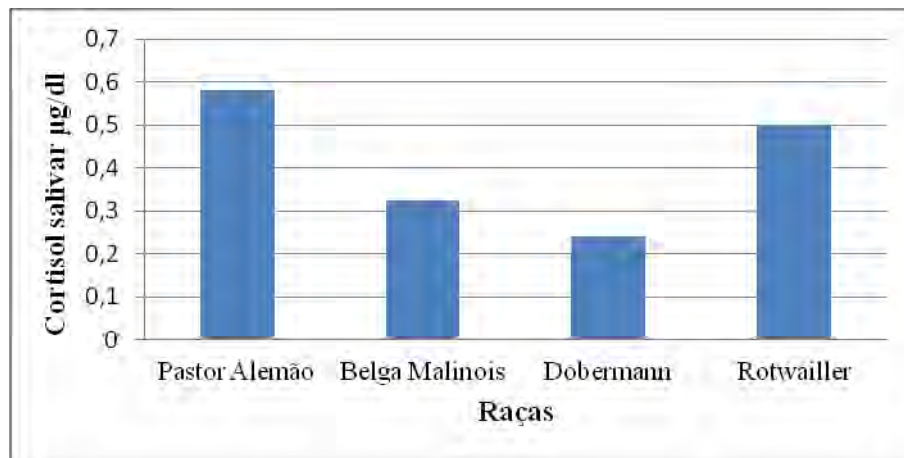
Tabela 4. Concentração de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) nas diferentes raças no período de trabalho.

Característica da amostra - Raça	Média	Desvio Padrão
Pastor Alemão	0,582 A	0,110
Belga Malinois	0,323 B	0,110
Dobermann	0,242 B	0,110
Rotwailer	0,496 A	0,110

Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

As letras indicam que são diferentes, $p < 0,05$.

Figura 9. Comparação entre as médias dos valores de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) coletados no Período de Trabalho nas diferentes raças.



Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

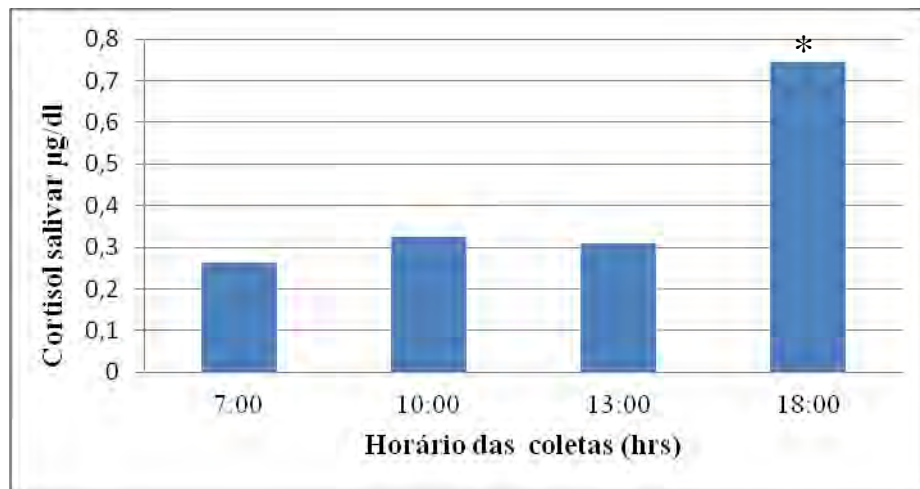
Ao avaliarmos as médias do cortisol salivar nos diferentes horários de coleta no Período Trabalho, observamos que não houve diferença significativa entre os horários das 07h00 (média = $0,264 \mu\text{g}/\text{dl}$), 10h00 (média = $0,324 \mu\text{g}/\text{dl}$) e 13h00 (média = $0,312 \mu\text{g}/\text{dl}$), sendo diferente estatisticamente apenas no horário das 18h00, o qual foi mais elevado, como demonstrado na tabela 5 e figura 10.

Tabela 5. Média do cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) por horário de coleta no Período Trabalho. As letras indicam a diferença entre eles.

Característica da amostra	Média	Desvio Padrão
Hora – 07h00	0,264 B	0,110
Hora – 10h00	0,324 B	0,110
Hora – 13h00	0,311 B	0,110
Hora – 18h00	0,745 A	0,110

Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

Figura 10. Comparação entre as médias dos valores de cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) no Período Trabalho em diferentes horários de coleta.



Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

No período destinado ao treinamento dos animais (PT), o qual compreende entre 07h00 e 10h00, não foi observado diferença estatística entre a interação raça e horário. Todavia no período que antecede a saída dos animais para o trabalho (13h00) o cortisol salivar foi mais alto na raça Rotwailer comparada as demais, que não apresentaram diferença significativa entre elas. Entretanto a raça Pastor Alemão obteve o maior nível de cortisol salivar no horário retorno do trabalho (18h00), quando comparada com as demais raças.

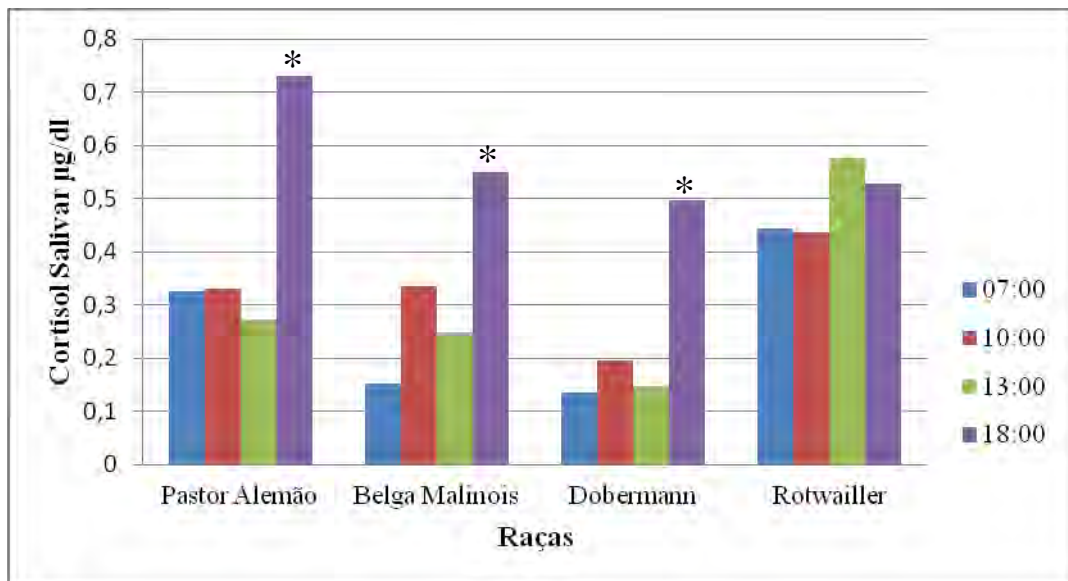
Analisando individualmente as raças em relação aos horários de coleta, a raça Rotwailer não apresentou diferença significativa em nenhum horário, mantendo-se relativamente constante desde o primeiro horário, já as raças Pastor Alemão, Belga Malinois e Dobermann obtiveram o cortisol salivar significativamente mais elevado no último horário (18h00) quando comprado aos demais (Tabela 6 e figura 11).

Tabela 6. Média do cortisol salivar ($\mu\text{g}/\text{dl}$) e sua interação entre os horários de coletas e raças avaliadas. As letras maiúsculas mostra a diferença nas colunas e letras minúsculas diferença nas linhas. Desvio padrão 0,220 e valores de $p < 0,05$.

Raças	Horário das Coletas			
	7:00	10:00	13:00	18:00
Pastor Alemão	0,326 Ab	0,331 Ab	0,271 Bb	0,73 Aa
Belga Malinois	0,153 Ab	0,334 Ab	0,248 Bb	0,55 Ba
Dobermann	0,134 Ab	0,195 Ab	0,146 Bb	0,497 Ba
Rotwailer	0,444 Aa	0,437 Aa	0,577 Aa	0,528 Ba

Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

Figura 11. Médias dos valores de cortisol salivar ($\mu\text{g/dl}$) e sua interação entre os horários das coletas e as raças avaliadas.



Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

5.3. Análise de Sêmen

A análise do sêmen se baseou em um total de 8 amostras conforme modelo padrão para animais domésticos, os parâmetros seminais: volume, cor, ph, motilidade, vigor, concentração, defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais.

Na análise de aspecto, as raças Pastor Alemão, Belga Malinois e Dobermann apresentaram sêmen com aspecto viscoso, de cor branco-acinzentado. A raça Rottwailer apresentou um sêmen com pouca viscosidade e coloração translúcida. A observação do volume destacou que todos os animais obtiveram um ejaculado com volume adequado.

As amostras colhidas nas raças Pastor Alemão, Belga Malinois, Dobermann, apresentaram motilidade de 80 – 90%, já na raça Rotwailer foi de 60% e o vigor apresentando pelos espermatozoides nas raças Pastor Alemão, Belga Malinois e Dobermann foi de 3 – 4 (bons) e na raça Rotwailer foi de 2 (muito lentos).

A concentração de espermatozoides variou entre 100.000 à 136.000 x 10³ espermatozoides/ml nas Raças Pastor Alemão, Belga Malinois e Dobermann, e na raça Rotwailer foi de 18.000 à 20.000x10³ espermatozoides/ml. As patologias de defeitos menores observadas foram cabeça curta e isolada normal; cauda e implantação retro e abaxial e gota citoplasmática distal e as patologias de defeitos maiores foram cabeça estreita na base, piriforme, e pequena anormal; gota citoplasmática proximal; defeitos de peça intermediária; cauda fortemente dobrada, dobrada com gota e enrolada na cabeça e formas duplas;

As alterações de defeitos menores e maiores, considerando os tipos de patologia, foram observadas em todas as raças, com a diferença da frequência apresentada, sendo observada em maior número na raça Rotwailer (defeitos totais 28 – 30,5 %). Conforme tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Resultados descritivos da avaliação seminal I.

<i>ANIMAL</i>	<i>RAÇA</i>	<i>VOLUME (ml)</i>	<i>COR</i>	<i>ODOR</i>	<i>PH</i>	<i>MOTILIDADE (%)</i>	<i>VIGOR (0-5)</i>
Kelvin	Pastor Alemão	6,5	Branco	<i>sui generis</i>	6,2	80	3
Gringo	Belga Malinois	7	Branco	<i>sui generis</i>	6,2	90	4
Egar	Rotwailer	8,5	translúcido	<i>sui generis</i>	6,6	60	2
Thor	Rotwailer	7,8	translúcido	<i>sui generis</i>	6,5	60	2
Pegus	Pastor Alemão	7,5	Branco	<i>sui generis</i>	6,2	80	3
Falcon	Belga Malinois	7	Branco	<i>sui generis</i>	6,2	90	4
Lotan	Dobermann	6,5	Branco	<i>sui generis</i>	6,3	80	3
Connors	Dobermann	7	Branco	<i>sui generis</i>	6,4	80	3

Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

Tabela 8. Resultados descritivos da avaliação seminal II.

<i>ANIMAL</i>	<i>RAÇA</i>	<i>CONSISTÊNCIA TESTICULAR</i>	<i>CONCENTRAÇÃO (Sptz totaisXml)</i>	<i>DEFEITOS MAIORES (%)</i>	<i>DEFEITOS MENORES (%)</i>	<i>DEFEITOS TOTAIS</i>
Kelvin	Pastor Alemão	3	128.356 X10 ³	10,5	2,5	13
Gringo	Belga Malinois	3	136.128X10 ³	6,5	2	8,5
Egar	Rotwailer	3	18.992X10 ³	26,5	4	30,5
Thor	Rotwailer	3	20.826X10 ³	25	3	28
Pegus	Pastor Alemão	3	110.544X10 ³	5,5	3	8,5
Falcon	Belga Malinois	3	129.124X10 ³	7,5	2,5	10
Lotan	Dobermann	3	126.020X10 ³	8	4	12
Connors	Dobermann	3	131.226X10 ³	5	3	8

Fonte: ARCURI, G.B. (2015)

6. Discussão

Na avaliação comportamental em repouso observamos que não houve diferenças entre as raças estudadas, sendo a posição deitada a mais destacada e não foi detectado apatia ou inatividade nos animais, contrapondo o descrito em cães submetidos a desafios (BEERDA et al., 1999; HEVERBEKE, 2008), cães de abrigo (HUBRECHT, 1992) e cães de laboratório (HETTS et al., 1992), os quais sob condições semelhantes, demonstraram esses dois comportamentos. Haug (2004) descreve um cão relaxado quando em posições como sentado ou deitado com os músculos sem tensão, conforme observamos nos cães avaliados.

Animais sob condições semelhantes de confinamento apresentaram segundo Heverbeke (2008), Beerda et al. (1999), Hubrecht (1992) e Hetts et al. (1992) a manipulação excessiva de partes do corpo (coçar, lambem e morder), coprofagia, vocalização excessiva, levantamento das patas, farejar e urinar repetidas vezes e comportamentos estereotipados. Estas informações contrapõe os nossos achados, uma vez que não detectamos em nenhuma das raças estudadas tais comportamentos. Todavia, o comportamento de atividade motora (comportamentos estereotipados e movimento) foi observado nas raças Rotwailer e Belga Malinois, bem como descrito por esses autores para cães submetidos a desafios, cães de abrigo e cães de laboratório.

Observamos algumas tendências de comportamentos entre as raças, não ocorrendo muita variabilidade. Isso pode ser atribuída a criação semelhante e a finalidade que ocorreu desde filhote, dentro do mesmo sistema de canil (HENNESSY et al., 1998; STEPHEN; LEDGER, 2005). A raça Rotwailer apresentou comportamento diferente das demais, o que pode ser explicado pela percepção individual que tem do ambiente e como o enfrenta. Esta individualidade entre as raças esta relacionada ao temperamento e a motivação para se engajar em certas atividades (SHILDER, 1992; COPPINGER e SCHNEIDER, 1995).

As concentrações de cortisol salivar dosadas em cães sob condições basais geralmente são relatados para serem de 0,02 a 0,3 ug/ dl (BENNET e HAYSEN, 2010; WENGER REGGENBACK et al., 2010), em nosso trabalho verificamos concentrações médias de cortisol salivar no Período Controle de 0,361 à 0,438 e no Período trabalho 0,312 à 0,592; esses resultados demonstram que mesmo em condições basais os cães de trabalho apresentam o nível de cortisol mais elevado.

Os níveis de cortisol no período de treinamento (Período trabalho) não tiveram alterações significativas, que vai de acordo com HEVERBEKE (2008), o qual descreve que, quando os animais são submetidos ao mesmo tipo de estímulo não ocorre alterações no

cortisol, indicando que os animais são capazes de lidar com os mesmos desafios, já que a rotina de treinamento e o ambiente são os mesmos, com pequenas variações. O aumento dos níveis de cortisol ocorreu ao retorno do trabalho, conforme SVOBODOVA et al., (2014), que relata que animais de trabalho quando em atividades externa sofrem constantes desafios, pois são expostos a muitas situações incomuns, tais como tráfego, distrações, incluindo o ruído, os contatos com pessoas desconhecidas e outros animais. Foram encontrados valores de cortisol mais elevados no período noturno e valores decrescentes durante o período diurno, o mesmo que descreve Camacho (1982), em cães clinicamente normais.

O confinamento pode ser fator de estresse para cães que não se adaptam ao ambiente confinado (BEERDA, 1999), foi o que observamos na raça Rotwailer, que não apresentou diferença significativa nas concentrações de cortisol salivar em todas as coletas, entretanto os animais mantiveram o nível de cortisol constantemente mais elevado, quando comparados as outras raças.

Características comportamentais estão ligadas a diferentes respostas fisiológicas e neuroendócrinas quando em situações de estresse e são consistentes ao longo do tempo. Alguns estudos encontraram alterações apenas na fisiologia ou apenas no comportamento (BEERDA et al., 1999), semelhante ao encontrado neste estudo, quando os cães retornaram do trabalho. Neste momento que o cortisol foi mais elevado e não houve comportamentos que demonstrassem estresse sugerindo que o comportamento e fisiologia de estresse, em alguns casos, podem operar de forma independente um do outro.

As análises do sêmen feitas individualmente, apresentaram resultados satisfatórios em todos os parâmetros, porém na raça Rotwailer observamos valores considerados abaixo do esperado nos padrões de concentração, motilidade, vigor e defeitos menores, maiores e totais. Os resultados encontrados vão ao encontro do descrito por Baptista Sobrinho et al.(2009) em cães de trabalho da raça Rotwailer, os quais também apresentaram modificações nestes parâmetros, porém não houve alterações na concentração e defeitos menores. As alterações de defeitos menores e concentração foi semelhante ao encontrado por Almeida et al (1998), que descreve essas patologias sendo um indicativos de mau funcionamento epididimário, devido a influência de agentes estressores.

As patologias de defeitos maiores servem como indicativo de alterações ocorridas durante a produção espermática. Quando em número elevado, caracterizam um sêmen de baixa fertilidade, mesmo que certos tipos de anormalidades possam não estar associados à infertilidade (VANNUCHI et al., 1998; HAFEZ, 2000). O estresse aumenta de modo significativo a porcentagem de defeitos maiores; em nosso trabalho destacamos que este

aumento deu-se principalmente à ocorrência de cabeças anormais soltas e caudas fortemente dobradas e enroladas.

As instalações do canil seguem em sua grande parte as exigidas pela normativa 40400/95, boxes individuais com uma área superior a 2 m² com solário, visando condições de bem estar para os animais com um espaço adequado. A estrutura é feita de alvenaria com paredes impermeabilizadas, a água não tem comunicação com outro boxe, cumprindo condições de higienização. Somente com relação ao cercado dos boxes que as laterais do solário são feitas de alvenaria e não de tela, mas a frente permite a visualização dos outros animais devido a construção de outros boxes, mantendo a finalidade do cercado de tela que seria o contato visual com outros animais.

7. Considerações finais

Com base nos resultados obtidos, concluímos que:

- Os animais das raças Pastor Alemão, Belga Malinois e Dobermann não sofrem distresse quando submetidos ao trabalho de faro, patrulhamento, guarda e proteção;
- As raças Pastor Alemão, Belga Malinois e Dobermann demonstraram boa capacidade de adaptação ao ambiente, destacando que não houve distresse de confinamento, uma vez que estes animais foram adaptados ao ambiente desde filhote;
- Em nenhuma das raças estudadas observamos correlações entre o comportamento e níveis de cortisol que indicassem distresse;
- A raça Rotwailer apresentou cortisol elevado, comportamentos estereotipados e maior taxa de anormalidades espermáticas, portanto acreditamos que não seja a raça mais indicada para os trabalhos desenvolvidos pelas polícias;
- Os animais das raças Pastor Alemão, Belga Malinois e Dobermann utilizadas neste estudo, não apresentaram estresse e tiveram uma boa qualidade seminal, portanto concluímos que as atividades desempenhadas por cães de trabalho militar não influenciam no manejo reprodutivo de cães machos.
- A raça Dobermann foi a que apresentou os melhores resultados comportamentais, níveis de cortisol salivar e qualidade seminal, sendo, portanto, a mais indicada para o desempenho do trabalho militar.

8. Conclusão

Através das avaliações executadas em nosso trabalho podemos concluir que cães militares que desempenham atividades de faro, obediência e localização de entorpecentes; apresentam um perfil diferenciado quando relacionamos com cães de companhia, nos quesitos comportamento e cortisol salivar.

As concentrações de cortisol salivar em cães sob condições de trabalho militar nas atividades de faro, obediência e localização de entorpecentes das raças Pastor Alemão, Belga de Malinois e Dobermann apresentaram uma elevação nos níveis basais mesmo durante o período de repouso, quando comparado com cães de companhia. Portanto fica estabelecido que cães de trabalho militar possuem a dose basal de cortisol salivar de 0,361 à 0,438 ug/dl, sem que haja qualquer alteração fisiológica ou afecções decorrentes deste perfil.

Nossos resultados estabelecem que cães da raça Rotwailer não apresentam o perfil ideal para trabalho militar nas atividades de faro, obediência e localização de entorpecentes, pois apresentam aumento constante nos níveis de cortisol salivar, alterações no comportamento e parâmetros seminais abaixo do ideal; portanto não são indicados para este tipo de atividade militar.

Através deste estudo podemos concluir que os cães militares da raça Dobermann são os mais indicados para as atividades de faro, obediência e localização de entorpecentes, pois apresentaram melhores resultados nos três parâmetros avaliados. Os animais mantiveram os níveis de cortisol salivar dentro da normalidade para cães de companhia (0,02 a 0,3ug/dl) não apresentando oscilações entre o período de trabalho e descanso; comportamentalmente não foi observado movimentos estereotipados e na análise de sêmen os parâmetros avaliados foram ideais, de acordo com o que é estabelecido para cães. Portanto esta raça Dobermann apresenta as melhores condições para o trabalho militar nas atividades de faro, obediência e localização de entorpecentes.

9. Referências

- ALMEIDA, S. A.; PETENUSCI, S. O.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; ROSA e SILVA, A. A. M.; LAMANO-CARVALHO, T.L. Decreased spermatogenic and androgenic testicular functions in adult rats submitted to immobilization-induced stress from prepuberty. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n.31, p.1443-1448, 1998.
- BAPTISTA SOBRINHO, C. A.; HATAMOTOZERVOUDAKIS, L. K.; BARNABE, V. H. NICHI, M.; OLIVEIRA, C. A. Efeitos do estresse de trabalho sobre parâmetros seminais de cães da raça Rottweiler. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 46, n. 4, p. 280-287, 2009.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; DE VRIES, H. W. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 52, p. 307-319, 1997.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; DE VRIES, H. W. MOL, J. A. Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. II. Hormonal and immunological responses. **Physiology & Behavior**. v.66, p. 243-54, 1999.
- BENNET, A.; HAYSSN, V. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 39, p.171-180, 2010.
- BISPO, D. L. N.; PEREIRA, O. C. M. Importância do conhecimento das alterações induzidas pelo estresse em animais domésticos. **Interciência**, v.19, n.2, p.72-74, 1994.
- BONDAN, E. F.; ORSINI, H. Fisiopatologia do estresse em animais selvagens em cativeiro e suas implicações no comportamento e bem-estar animal. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v.24, n.1, p.7-13, 2006.
- BRASIL. Secretaria Nacional de Segurança Pública. Norma Técnica de Padronização para Canis de Segurança Pública. Ministério da Justiça, 2011.
- BREEN, K.M.; KARCH, F.J. Does cortisol inhibit pulsatile luteinizing hormone secretion at the hypothalamic or pituitary level? **Endocrinology**, n.145, p.692-698, 2004.
- BROOM, D.M. Indicators of Poor Welfare. **British Veterinary Journal**: v.142, p.524-526. 1986.
- BROOM, D. M.; JOHNSON, K. G. **Stress and animal welfare**. London: Champman & Hall, 1993. 221 p.
- BROOM, D. M., FRASER, A. F. **Comportamento e Bem-estar de animais domésticos**. Barueri, São Paulo: Manole, 2010 (4ª ed.).
- BROWN, R. E. Steroid and thyroid hormone receptors. In: BROWN, R. E. (Ed.). **An introduction to neuroendocrinology**. London: Routledge & Kegan Paul, 1994. p. 1-102.
- BURGHARDT, W.F. Behavioral considerations in the management of working dogs.

Veterinary Clinics Small Animal. v.33, p.417–46, 2003.

CAMACHO, A. A. **Determinação dos níveis séricos de cortisol pelo método de radioimunoensaio em cães clinicamente normais**. 1982. 22 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1982.

CARENZI, C.; VERGA, M. Animal welfare review of the scientific concept and definition. **Italian Journal of Animal Science**; v.8, p.21-30, 2009.

CARLSTEAD, K.; BROWN, J.L.; STRAWN, W. Behavioral and physiological correlates of stress in laboratory cats. **Applied Animal Behaviour Science**, Amsterdam, v. 38, p. 143-158, 1993.

CARRAMENHA, C. P.; CARREGARO, A. B. Estresse e morte súbita em Medicina Veterinária. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, v.28, n.2, p. 090-099, 2012.

CASE, L. P.; CAREY, D. P.; HIRAKAWA, D. A. Atividades e estresse. In: CASE, L. P.; CAREY, D. P.; HIRAKAWA, D. A. **Nutrição canina e felina**. Madrid: Harcourt Brace de Espanha, p. 219-226, 1998.

CASTRO, M.; MOREIRA, A. Análise Crítica do Cortisol Salivar na Avaliação do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal. **Arquivo Brasileiro Endocrinologia & Metabolismo**, v. 47, n. 4, p. 358-367, 2003.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed., Belo Horizonte-MG, p.52, 1998.

COPPINGER, R; SCHNEIDER, R. **Evolution of working dogs**. In The domestic dog: its evolution, behaviour and interactions with people. p.21 –47. ed. J. Serpell. Cambridge: University Press, Cambridge, UK, 1995.

CUI, K.H. The effects of stress on semen reduction in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). **Human Reproduction**, Oxford, v. 11, n. 3, p. 568-573, 1996.

CUNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

DARLINGTON, T.K.; STAKNIS, D.; GEKAKIS, N.; STEEVES, T.D.L.; WEITZ, C.J.; TAKAHASHI, J.S.; KAY, S.A. Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. **Science**, Washington, v. 280, p.1599-1602, 1998.

DARWIN, C. **A origem das espécies**. Rio de Janeiro: Ediouro, 2004. (Trabalho original publicado em 1860).

DAWKINS, M. S. **Explicando o comportamento animal**. São Paulo: Malone LTDA, v. 1, p.159, 1989.

DOBSON, H.; SMITH, R. F. Stress and reproduction in farm animals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 451-461, 1995.

DUKES, H. H. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

DUNCAN, I. J. H. Science-based assessment of animal welfare. Farm animals. **Scientific and Technical Review of Office International Epizooties** ; v.24 p.483-492, 2005.

ELIAS, L. L.; CASTRO, M. Controle neuroendócrino do eixo-hipotálamo- hipófise- adrenal. In: ANTUNES-RODRIGUES J.; MOREIRA A. C.; ELIAS L. L. K.; CASTRO M. **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

ETIM, N. N.; OFFIONG, E. E. A.; EYOH, G. D.; UDO, M. D; Stress and animal welfare: an uneasy relationship. **European Journal of Advanced Research in Biological and Life Sciences**, v.1, n. 1, p. 9- 16 , 2013.

FOWLER, M. E. Stress. *In: Zoo & wild animal medicine*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 1986. p. 335.

GONÇALVES, M. A. B, DASILVA, S. L., TAVARES, M. C. H., GROSMANN, N. V., CIPRESTE, C. F., & DI CASTRO, P. H. G. Comportamento e bem-estar animal: o Enriquecimento Ambiental. In Andrade, A., Andrade, M.C.R., Marinho, A. M., & Ferreira Filho, J. **Biologia, Manejo e Medicina de Primatas não-humanos na Pesquisa Biomédica**. (Cap.5). Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2010.

GORDON, K. **A history of the first British Police dog section**. London: British Transport Police History Society. [http: www.btp.police.uk/](http://www.btp.police.uk/). Acesso em 23 de agosto de 2014.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. Os hormônios adrenocorticais. *In: Guyton AC. Tratado de fisiologia médica*. 9ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 871-80.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Avaliação do sêmen In: AX, R. L., DALLY, M., DIDION, A. B., LENZ, R. W., LOVE, C. C., VARNER, D. D., HAFEZ, B., ELLIN, M. E. **Reprodução Animal**. 7ª ed. São Paulo: Manole, p. 372-373, 2004.

HARVERBEKE, A.; DIEDERICH, C.; DEPIEREUX, E.; GIFFROY, J. M. Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. **Physiology & Behavior** v. 93, p. 59–67, 2008.

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

HETTS, S.; CLARK, J. D.; CALPIN, J. P.; ARNOLD, C. E.; MATEO, J.M. Influence of housing conditions on beagle behaviour. **Applied Animal Behavior Science**, v.34, p. 137–55, 1992.

HUBRECHT, R. C.; SERPELL, J. A.; POOLE, T. B. Correlates of pen size and housing conditions on the behavior of kennel dogs. **Applied Animal Behavior Science**, v.34, p.365–383, 1992.

- LEMISH, M. G. **War Dogs: A history of loyalty and heroism**. Massachusetts: Brassey's, 1999, 284 p.
- LINDBERG, C. Animal behaviour and animal welfare. **Journal of Biological Education**, v. 29, p.16-22, 1995
- LIPP, M. *et al.* **stress: conceitos básicos. Pesquisas sobre stress no Brasil**. Campinas: Papirus, 1996.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of dogs. Washington: **National Academy Press**, 1985. 78 p.
- MASON, G. J. Stereotypies: a critical review. **Animal Behaviour**, v 41, p 1015-37, 1993.
- MATTERI, R. L.; CARROLL, J.A; DYER, C. J. Neuroendocrine responses to stress. In: Moberg, G.P., Mench, J.A. **The biology of animal stress: Basic principles and implications for animal welfare**. CAB International, Wallingford, UK, p. 43-76, 2000.
- McEWEN, B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, p.172-189, 2000.
- MOBERG, G. P. Suffering from stress: an approach for evaluating the welfare of an animal. **Acta Agriculturae Scandinavica. Section A, Animal Science**, Suppl. 27, p. 46-49, 1996.
- MOBERG, G.P. Biological response to stress: implications for animal welfare. In MOBERG, G.P; MENCH, J. A. **The Biology of animal stress**. CABI publishing: Wallingford, UK, p. 1-22, 2000.
- MOSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 67-74, 2002.
- MORMEDE, P.; ANDANSON, S.; AUPERIN, B.; BEERDA, B.; GUEMENE, D.; MALMKVIST, J.; MANTECA, X.; MANTEUFFEL, G.; PRUNET, P.; VAN REENEN, C. G.; RICHARD, S.; VEISSIER, I. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Physiology and Behavior**, v. 92, p.317-339, 2007.
- MWANGI, J. N.; ALERI, J. W.; MOGOA, E. G.; MBITHI, P. M. F. Indicators of Poor Welfare in Dairy Cows Within Smallholder Zero-Grazing Units in the Peri-Urban Areas of Nairobi, Kenya. **Insights from Veterinary Medicine**, 2013.
- NETO, J. C. L; BARBOSA, J. C.; LUNARDI, L. O.; ROSA, A. A. M.; GENARO, G. Effects of surgical stress on the secretion of luteinizing hormone, testosterone and cortisol in the domestic cat. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.5, p. 211-214, 2006.
- PACHALY, J.R.; WERNER, P.R.; SCHIMANSKI, J.C.; CIFFONI, E.M.G. Estresse por captura e contenção em animais selvagens. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v.13, n. 74, p. 47-52, jul./ago. 1993.
- PEDERSON, B. K. Animal welfare: A holistic approach. **Acta Agriculturae Scandinavica**,

v.27,p.76-81, 1996.

SÃO PAULO. Polícia Militar do Estado de São Paulo. **Instrução Normativa para Organização e Funcionamento dos Canis da Polícia Militar I-19 PM**. Publicado Bol G PM 162/88, 1988.

RAFF, H. Salivary Cortisol: A Useful Measurement in the Diagnosis of Cushing's Syndrome and the Evaluation of the Hypothalamic Pituitary-Adrenal Axis. **The Endocrinologist**, v. 10, p. 9-17, 2000.

RANDALL, D. J.; BURGGRN, W.;FRENCH, K. **Fisiologia animal: Mecanismos e Adaptações** (4ª ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RIVIER, C., RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Peripheral and central mechanisms. **Biology of Reproduction** n.45, p.523-532, 1991.

ROBERT, L.;ROLAK, T. Use of Police canine units in narcotic searches of vehicles. School of Police Staff and Command: Trenton Police Department, 2000.

ROMERO, L. M; BUTLER, L. K.Endocrinology of stress. **International Journal of Comparative Psychology**,V. 20, P.89-95, 2007.

SÃO PAULO. Decreto nº 40400, de 24 de outubro de 1995. Normas técnicas especiais relativas às instalação de estabelecimentos veterinários. Diário Oficial v.105, n.204, 1995.

SELYE, H.A. **The story of the adaptation syndrome**. Montreal: Acta, 1952.

SELYE, H. **The stress of life**. New York: McGraw-Hill, 324 p., 1959.

SELYE, H.A. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. **TheJournal of Clinical Endocrinology**, v. 6, n. 2, p. 117-230, Feb. 1946.

SCHILDER, M. B. Stress and its welfare parameters in dogs. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, v.117 (Suppl. 1), p.53-54, 1992.

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

SNOWDON, C. T. O significado da pesquisa em Comportamento Animal, **Estudos de Psicologia**, Universidade de Wisconsin, v. 4, p. 365-373, 1999.

SPANGENBERG, E. M. F.; BJÖRKLUND, L.; DAHLBORN, K. Outdoor housing of laboratory dogs: effects on activity, behaviour and physiology. **Applied Animal Behaviour Science**. v.98, p. 260-76, 2006.

SPRAKER, T. Stress and capture myopathy in artiodactylids. In FOWLER, M.E. **Zoo & wild animal medicine**. 3. ed. Philadelphia : W. B. Saunders, 1993, p. 481-487.

SUNDQVIST, C.;AMADOR, A. G;BARTKE, A. Reproduction and fertility in the mink

(mustela vison). **Journal of Reproduction and Fertility**, n.85, p.413-441, 1989.

SVOBODOVA, I.; CHALOUPKOVA, H.; KONCEL, R.; BARTOS, L.; HRADCKA, L.; JBAVY, L.; Cortisol and Secretary Immunoglobulin A Response to Stress in German Shepherd Dogs. **Plos one**. V. 9, ed 3, p. 1-5, 2014.

STEPHEN, J.M.; LEDGER, R.A. An audit of behavioral indicators of poor welfare in kennelled dogs in the United Kingdom. **Journal of applied animal welfare science**, v. 8, ed. 2, p.79-95, 2005.

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

TILBROOK, A.;CANNY, B.;SERAPIGLIA, M.;AMBROSE, T.;CLARKE, I. Suppression of the secretion of luteinizing hormone due to isolation/restraint stress in gonadectomised rams and ewes is influenced by sex steroids. **Journal of Endocrinology**, n.160, p. 469- 481, 1999.

TILBROOK, A. J.;TURNER, A.I.; CLARKE, I.J. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: The role of glucocorticoids and sex differences. **Reviews of reproduction**, n. 5, p. 105-113, 2000.

TILBROOK, A. J.;TURNER, A.I.; CLARKE, I.J. Stress and reproduction: Central mechanisms and sex differences in non-rodent species. **Stress-the International Journal on the Biology of Stress**, n.5, p. 83-100, 2002.

TUNN, S.; MÖLLMANN, H.; JÜRGEN, B. Simultaneous Measurement of Cortisol in Serum and Saliva after Different Forms of Cortisol Administration. **Clinical Chemistry**, v. 38, p. 1491-1494, 1992.

VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. Avaliação seminal em cães- aspectos práticos. **Clínica Veterinária**, v. 3, n. 15, p. 22-27, 1998.

VINING, R. F; MCGINLEY, R. A;MAKSVYTIS, J. J. Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 20, p. 329-335, 1983.

WENGER-RIGGENBACH, B.; BORETTI, F.S.; QUANTE, S.;SCHELLENBERG, S.; REUSCH, C.E.; SIEBER-RUCKSTUHL, N.S. Salivary cortisol concentrations in healthy dogs and dogs with hypercortisolism, **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.24: p 551–556, 2010.