

ADRIANA KÁTIA DA ROCHA NEVES

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE DE CÃES SUBMETIDOS À ESTERILIZAÇÃO
QUÍMICA POR MEIO DE INJEÇÃO INTRATESTICULAR DE SOLUÇÃO À
BASE DE ZINCO.**

RECIFE – PE

2014

ADRIANA KÁTIA DA ROCHA NEVES

Médica Veterinária

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE DE CÃES SUBMETIDOS À ESTERILIZAÇÃO
QUÍMICA POR MEIO DE INJEÇÃO INTRATESTICULAR DE SOLUÇÃO À
BASE DE ZINCO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª Erika Christina Oliveira Santos

RECIFE – PE

2014

A Deus, pela vida, força e sabedoria.

OFEREÇO

A Sóstenes e Marluce, meus pais,
ao meu marido Wellington e a toda
minha família.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção, força e coragem nas horas de dificuldade, ajudando-me a alcançar meus objetivos, dando – me força para chegar até o fim dessa jornada;

Aos meus pais Sóstenes e Marluce, pelo amor incondicional, pela educação e exemplo de honestidade e integridade, estando sempre presente em todos os momentos da minha vida;

Às minhas irmãs, Claudia e Andreia, pelo amor e por todos os momentos compartilhados; e meus sobrinhos Allanzinho e Cauã, que só me trazem alegria, por me fazerem esquecer as preocupações e angústias do cotidiano;

Ao meu marido Wellington Pereira pelo companheirismo, pela paciência, força e motivação, estando sempre presente em todos os momentos da minha vida;

À minha tia Lúcia e minhas primas Debbie, Gabi e Bob, pela amizade sincera e pelo apoio em todos os momentos que precisei;

À Prof.^a Erika Oliveira pela amizade, por me acolher, pelos ensinamentos, orientação e amizade, que muito vem contribuindo, ajudando-me a formar meu perfil profissional e pessoal e pela contribuição no meu crescimento durante o curso;

À Thais Ferraz, que me acompanhou durante todo o experimento, dedicando-se ao trabalho, pela amizade formada, e pelos muitos bons momentos que passamos de conversas, aflições e acima de tudo de aprendizado;

À Telga Lucena por ter possibilitado o processamento e análise das amostras no Laboratório Zoonálises, pelo apoio e pela amizade;

Às Médicas Veterinárias Cibele Cavalcanti, Giselle Barbosa, e Simone Gutman pela disponibilidade, pelo apoio técnico, pela amizade formada, e pelo auxílio em vários momentos na condução do experimento;

Ao BIOPA-UFRPE por permitir o processamento das análises;

Ao Prof. Dr. Hélio Manso pela atenção e solicitude dispensadas em vários momentos que precisei;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, especialmente ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal Tropical, pela oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa;

Aos proprietários que permitiram a inserção dos seus animais no projeto, contribuindo para a realização do mesmo;

À todos que de alguma forma estiveram presentes durante o meu trabalho, pelo apoio e amizade.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
CAPÍTULO 1	xi
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Métodos cirúrgicos	13
2.2 Agentes esclerosantes	14
2.2.1. Solução a base de gluconato de zinco	15
2.3. Dor x Estresse	16
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	18
CAPÍTULO 2	25
ARTIGO 1	26
Marcadores de estresse em cães	26
RESUMO	26
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO	26
O mecanismo de ação e reação do estresse	27
Resposta comportamental	28
Resposta do Sistema Nervoso Autônomo	29
Resposta neuroendócrina	30
Cortisol	30
Glicose	32
Prolactina	33
Hormônios da tireoide	33

Hormônio do crescimento (GH)	34
Resposta imune	34
Proteína C-reativa	36
Haptoglobina	36
Imunoglobulina A (IgA)	37
CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
CAPÍTULO 3	44
Avaliação do estresse de cães submetidos à esterilização química por meio de injeção intratesticular de solução à base de zinco em comparação com a orquiectomia.	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1. Animais	47
2.2. Procedimento anestésico	47
2.3. Orquiectomia	48
2.4. Esterilização química por meio de injeção intratesticular de gluconato de zinco	48
2.5. Grupo controle	49
2.6. Momentos de avaliação	49
2.7. Avaliação do comportamento	49
2.7.1. Escala de Melbourn	49
2.7.2. Questionário ao Proprietário	49
2.8. Amostras	50
2.9. Análise estatística	50
3. RESULTADOS	51
3.1. Avaliação do comportamento	52
3.1.1. Escala de Melbourn	52

3.1.2. Questionário ao Proprietário	52
3.2. Avaliação do cortisol	53
3.3. Avaliação da glicose sérica	54
3.4. Avaliação dos Neutrófilos	54
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÕES	59
6. REFERÊNCIAS	59
CONCLUSÕES GERAIS	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
ANEXO I	66
ANEXO II	68
ANEXO III	71
ANEXO IV	73

RESUMO

A superpopulação de cães nos centros urbanos ocasiona sérios problemas de saúde pública e bem-estar animal. Métodos alternativos de contracepção têm sido bastante discutidos, mas ainda existe polêmica no que diz respeito ao efeito álgico dos agentes esclerosantes. Este trabalho teve o propósito de caracterizar o grau de desconforto causado pela castração química por meio da injeção intratesticular de gluconato de zinco e comparar com o procedimento convencional da orquiectomia, levando-se em consideração parâmetros comportamentais e bioquímicos, além de avaliar o grau de sensibilidade de tais parâmetros. O presente estudo foi conduzido na cidade do Recife, Brasil, entre os meses de abril a dezembro de 2013. Dezenove cães machos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: G1 (controle – submetidos apenas à procedimento anestésico), G2 (orquiectomia) e G3 (injeção intratesticular de gluconato de zinco). As avaliações foram realizadas em cinco diferentes momentos (M0, M1, M2, M3 e M4), onde foram avaliados cortisol plasmático, glicose sérica, leucograma de estresse (neutrófilos/linfócitos) e grau de desconforto por meio da Escala de Melbourne. Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de cortisol e contagem de leucócitos. O grau de desconforto foi maior no G2, apesar de não ultrapassar o escore de dor leve segundo a Escala de Melbourne. A concentração sérica de glicose foi estatisticamente maior no G3 quando comparada com o G2, embora ambos tenham sido semelhantes ao grupo controle. Diante dos resultados concluiu-se que a esterilização química causa um desconforto similar àquele gerado pelo procedimento de orquiectomia, podendo ser utilizado como procedimento de rotina no controle da fertilidade de cães.

Palavras chave: *Canis lupus familiaris*, bem estar, gluconato de zinco, controle populacional, dor

ABSTRACT

The overpopulation of dogs in urban areas causes serious problems to public health and animal welfare. Alternative methods of contraception have been widely discussed, but there is still controversy regarding the painful effects of sclerosing agents. This study aimed to characterize the degree of discomfort caused by chemical castration by zinc gluconate intratesticular injection and compare it with the conventional procedure of orchiectomy, taking into consideration both behavioral and biochemical parameters, and also to evaluate the degree of sensitivity of such parameters. This study was conducted in the city of Recife, Brazil, between April and December 2013. Nineteen male dogs were randomly divided into three groups: G1 (control – subjected to anesthesia only), G2 (orchiectomy) and G3 (zinc gluconate intratesticular injection). The evaluations were performed at five different moments (M0 , M1 , M2 , M3 and M4) , in which were evaluated plasma cortisol , serum glucose , stress leukogram (neutrophils / lymphocyte) and pain level according to the Melbourne Scale. No significant differences in the concentrations of cortisol and leukocyte count were found. The degree of discomfort was higher in G2, despite not exceeding the mild pain score according to the Melbourne Scale. Serum glucose concentration was statistically higher in G3 compared with G2, even though both were similar to the control group. In face of the results it was concluded that chemical sterilization causes similar discomfort to that generated by orchiectomy procedure and can be used as a routine procedure in the control of fertility in dogs.

Keywords: Canis lupus familiaris, welfare, zinc gluconate, population control, pain

LISTA DE FIGURAS

- Gráfico 1.-** Variação da pontuação obtida através da utilização da Escala de Dor da universidade de Melbourn em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química, nos diferentes momentos avaliados..... 52
- Gráfico 2.-** Classificação subjetiva da dor segundo observação do proprietário (1) e período (em dias) de desconforto observado pelos proprietários (2). 53
- Gráfico 3.-** Variação na concentração plasmática de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química, nos diferentes momentos de avaliação 53
- Gráfico 4.-** Variação na contagem sanguínea de neutrófilos ($\times 10\mu\text{g/dL}$) em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química, nos diferentes momentos de avaliação 55

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Volume da solução à base de zinco injetada no testículo dos cães segundo o diâmetro testicular dos mesmos _____ 48
- Tabela 2** – Análise de variância, com dois fatores e medidas repetidas, para os diferentes biomarcadores sanguíneos e comportamentais em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química _____ 51
- Tabela 3** – Concentração sérica de glicose* (mg/dL) de cães submetidos à orquiectomia e esterilização química por meio de injeção intratesticular de gluconato de zinco ____ 54
- Tabela 4** – Variação da pontuação obtida através da utilização da Escala de dor da Universidade de Melbourn em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química__ 74
- Tabela 5** – Variação na concentração plasmática de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química _____ 74
- Tabela 6** – Variação na contagem de neutrófilos ($\times 10^3 \mu\text{g/dL}$) em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química _____ 75

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que a população canina esteja em torno de 10% da humana na área urbana devido à reprodução descontrolada de cães e gatos errantes, ocasionando sérios problemas à saúde animal e pública (Mascarenhas, 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde (1990), as atividades isoladas de recolhimento e eliminação de cães e gatos não são efetivas para o controle da dinâmica dessas populações, sendo necessário, portanto, atuar na causa do problema: a procriação animal sem controle, e a falta de responsabilidade do ser humano quanto à sua posse, propriedade ou guarda. Métodos alternativos de contracepção em cães e gatos têm sido bastante discutidos, principalmente no que diz respeito às fêmeas, entretanto, cada macho intacto é um reprodutor em potencial, podendo gestar várias fêmeas por ano. Na espécie canina, a contracepção em machos, pode ser realizada por métodos cirúrgicos, imunológicos, hormonais ou químicos. A castração química tem sido sugerida como alternativa rápida e de baixo custo, que poderia ser utilizada em larga escala na população canina e felina, especialmente nas regiões de populações carentes onde o problema é mais intenso (Immegart e Threlfall, 2000; Cedilho et al, 2006). Entre os diversos agentes esclerosantes utilizados em machos caninos e felinos, estão o dimetil-sulfóxido (Pineda et al., 1977; Pineda e Doley, 1984), ácido láctico (Nishimura et al., 1992), gluconato de zinco (Fahim et al, 1993; Oliveira et al., 2007), glicerol (Immegart e Threlfall, 2000), clorexidina (Aiudi et al., 2010) e cloreto de cálcio (Baran et al., 2010). Alguns desses agentes causam dor e febre, inflamação ou até mesmo orquite grave após injeção intratesticular (Jana et al., 2005). Apesar da variedade de agentes químicos utilizados com a finalidade de contracepção, há relatos de dor e pirexia em ratos (Jana e Samantha, 2006), cães (Soto et al., 2007) e gatos (Jana e Samanta, 2011). A contracepção química com produtos contendo gluconato de zinco é considerada um procedimento seguro e eficaz (Wang, 2004; Bowen, 2008; Soto et al., 2009; Oliveira et al., 2011), e apesar de alguns estudos sugerirem que o produto não produz efeito algico perceptível (Tepsumethanon et al., 2005; Soto *et al* 2009; Oliveira et al., 2011), não existem avaliações direcionadas especificamente para este quesito.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A maioria dos centros urbanos enfrenta problema de animais mantidos sem controle, oferecendo riscos à saúde, à segurança pública, ao bem estar animal e ao meio ambiente, onerando o poder público com investimentos necessários para o controle populacional (Nassar e Fluke, 1991). Da mesma forma que se tem comprovado que o recolhimento e a eutanásia de animais domésticos não reduzem a superpopulação nos grandes centros urbanos e municípios, tem-se que a esterilização em massa é um dos métodos eticamente preconizados e de eficácia constatada para controle populacional.

Apesar da grande preocupação com contracepção em fêmeas, no Brasil, os relatórios sobre a dinâmica da população canina mostram que os machos são maioria, entre 60 e 70% do total da população canina, e as fêmeas entre 30 e 40% do total da população canina (Soto et al., 2007). Por esta razão tem-se buscado técnicas alternativas de contracepção em machos, que sejam seguras, menos invasivas e de baixo custo.

O bloqueio reprodutivo do macho pode ser obtido por meio de intervenção cirúrgica, por terapias hormonais, imunológicas e pelo uso de agentes esclerosantes nos testículos.

2.1 Métodos cirúrgicos

A orquiectomia é o método contraceptivo mais utilizado para esterilização de cães e gatos. A remoção dos órgãos reprodutores se dá sob anestesia geral e pode ser realizada pelas técnicas aberta ou fechada, que se referem à abertura ou não da túnica vaginal, sendo o método fechado, o mais comumente utilizado (Slatter, 2003). De acordo com Johnston et al. (2001), a orquiectomia bilateral é um método completamente eficaz, que inclui diversos benefícios como prevenção do surgimento de neoplasias, torção do cordão espermático, orquites e epididimites, além da supressão ou erradicação de sinais clínicos associados a doenças andrógeno-dependentes como hipertrofia prostática benigna, prostatite crônica, adenoma perianal, hérnia perianal e alopecia responsiva a castração. Uma vantagem muito desejada que esta técnica traz, é a redução significativa do comportamento sexual, incluindo marcação territorial, agressividade e comportamento de monta, que muitas vezes é intolerável aos proprietários.

Estudos têm destacado que para que ocorra a efetividade do programa de esterilização cirúrgica no controle de população animal, há necessidade que uma elevada porcentagem de cães seja submetida a este método por um longo período de tempo (Amaku et al., 2003). Sendo a orquiectomia um procedimento que exige

profissionais especializados e ambiente asséptico, nem sempre essas medidas são possíveis. Além do exposto, existem algumas complicações pós-operatórias, que incluem hemorragias, infecções, obesidade (Johnston et al., 2001; German, 2006; Kustritz, 2005; Brunetto, 2011) e incontinência urinária (Johnston et al., 2001). No cão, os hematomas e edema escrotal são comumente observados após a incisão escrotal. As hemorragias após a castração podem ser graves e podem resultar em hemorragia na cavidade abdominal (Boothe, 2003). Além disso, a dor acompanha todas as operações envolvendo tecido inervado e pode contribuir para morbidade pós-operatória (Almeida et al., 2006). O período pós-operatório também decorre com sofrimento, podendo essa sensação dolorosa evoluir para cronicidade (Duncan, 2005).

2.2 Agentes esclerosantes

Injeções intratesticulares têm sido investigadas como método de indução de contracepção em machos por mais de cinco décadas (Kutzler e Wood, 2006). Diversos agentes esclerosantes tem sido utilizados para esterilização em machos caninos e felinos, entre os quais estão o dimetil-sulfóxido (Pineda et al., 1977; Pineda e Doley, 1984), ácido láctico (Nishimura et al., 1992), gluconato de zinco (Fahim et al, 1993; Oliveira et al., 2007), glicerol (Immegart e Threlfall, 2000), clorexidina (Aiudi et al., 2010) e cloreto de cálcio (Baran et al., 2010). Essas substâncias podem ser aplicadas nos testículos, epidídimo e ducto deferente (Immegart e Threlfall, 2000). Quando injetadas no parênquima testicular, os agentes esclerosantes levam à atrofia testicular com decréscimo da espermatogênese, e da concentração de andrógenos, contribuindo para diminuição de alterações andrógeno-dependentes. Com a aplicação da droga no testículo ocorre uma resposta sistêmica imune, devido à ruptura da barreira de células de Sertoli, além de inflamação local com liberação de antígenos testiculares (Johnston et al, 2001). Quando injetadas no ducto deferente ou epidídimo, essas substâncias induzem uma oclusão fibrosa, resultando em azoospermia.

Segundo Kutzler e Wood (2006) o procedimento não exige muita técnica, é barato e adequado para programas de esterilização em larga escala em animais domésticos e selvagens. Mas, pesquisas que envolvem esterilização química de machos são restritas, e um dos fatores está relacionado aos resultados obtidos com a maioria dos agentes esclerosantes, que não resultam em azoospermia e causam irritação ou ulceração na

bolsa escrotal (Fahim et al., 1993). Outras reações locais e sistêmicas adicionais notificadas após injeções intratesticulares incluem dermatite e auto-mutilação escrotal, edema no prepúcio, vômitos, diarreia, anorexia, letargia e leucocitose (FDA, 2003).

Existem ainda polêmica e questionamentos em relação à dor e sofrimento dos animais castrados quimicamente. Jana e Samanta (2011) relatam sinais de desconforto temporário em gatos tratados com injeção de cloreto de cálcio, em até cinco minutos após aplicação. Num trabalho realizado por Muller et al. (2010), utilizando gluconato de zinco para esterilização em cães machos, foi observado que alguns animais apresentaram desconforto, caracterizado por vocalização e ausência de apetite, nas primeiras oito horas. Soto et al. (2007) relatam dor e sensibilidade em 4% dos animais no primeiro dia de tratamento utilizando gluconato de zinco associado ao DMSO. Jana e Samanta (2006) também relatam dor e pirexia em ratos. No que concerne ao gluconato de zinco, vários trabalhos sugerem que o produto não produz efeito algíco perceptível (Tepsumethanon et al., 2005; Soto et al., 2009; Oliveira et al., 2011).

2.2.1. Solução a base de gluconato de zinco

O zinco é essencial para o crescimento normal, reprodução e expectativa de vida dos animais e tem efeito benéfico no processo de reparação tecidual e cicatrização. É considerado não-carcinogênico, não-teratogênico e não-mutagênico (Leonard et al., 1987). O zinco tem pH neutro e faz parte da composição do plasma seminal e dos tecidos do trato reprodutor masculino. Em baixas concentrações é importante para a espermatogênese (incorpora-se ao flagelo das espermátides alongadas e também é encontrado nas fibras densas externas da cauda do espermatozoide) (Fahim et al., 1993), mas em concentrações elevadas inibe a divisão e replicação das células germinativas e causa fragmentação da membrana celular e do núcleo (Fahim et al., 1993).

Segundo Wang (2002), o gluconato de zinco provoca atrofia dos túbulos seminíferos com formação de tecido de granulação e oclusão fibrosa à passagem de espermatozoides. Entretanto acredita-se que a injeção intratesticular a base de zinco tenha uma ação mais específica sobre a espermatogênese, através de uma reação inflamatória exacerbada no local, causando a ruptura da barreira hematotesticular e reação imunomediada contra as células do compartimento adluminal, resultando em injúria celular (Oliveira, 2007; Muller et al., 2010).

Um produto a base de gluconato de zinco foi descrito por Fahim et al. (1993), que injetou Neutersol (Pet Healthcare International, Inc., Columbia, MO, EUA), nos epidídimos de cães. Posteriormente foi injetado nos testículos de cães adultos. O produto tornou-se comercialmente disponível nos EUA em 2003, e foi retirado do mercado em 2005. No entanto, está disponível no México desde 2008 (Esterisol, Ciências arca, New York, NY, EUA) (Purswell e Jochle, 2010).

Em estudo realizado por Oliveira (2012) com cães púberes (8 meses a 4 anos de idade) demonstrou-se que a espermatogênese foi substancialmente suprimida 60 – 150 dias após o tratamento.

Desde 2003, um outro produto a base de gluconato de zinco neutralizado pela arginina (Testoblock , bioliberação Technologies, Birmingham , AL , EUA) , foi avaliado para castração química de cães machos por injeção intratesticular . Oliveira et al (2007), relataram uma investigação morfológica e ultra-estrutural dos testículos de cães (8 meses a 4 anos de idade) após o tratamento com injeção intratesticular de Testoblock, comprovando o comprometimento da espermatogênese e sugerindo irreversibilidade. Mais recentemente, Soto et al. (2009) avaliaram um novo esterilizante injetável para cães machos (Infertile , Rhobifarma , Hortolândia , SP, Brasil), que é semelhante ao Neutersol / Esterisol, embora com algumas diferenças na formulação. Uma diferença é a adição de dimetil sulfóxido como um "veículo" para ajudar na distribuição da droga no testículo. Além disso, o Infertile tem aproximadamente o dobro da concentração de gluconato de zinco. A injeção intratesticular de Infertile em jovens e adultos machos não resultou em azoospermia, embora tenha resultado na redução da motilidade e concentração espermática 12 meses após injeção (Soto et al., 2009).

2.3. Dor x Estresse

No Brasil, assim como em outros países, devido à relação estabelecida entre o cão e o ser humano, existe uma preocupação crescente com o bem-estar animal. Desde que os animais são considerados seres sencientes, capazes de experimentar dor e sofrimento, existe o interesse em evitar e minimizar essas sensações.

Durante muito tempo a dor foi negligenciada, tanto em animais quanto em humanos. No entanto, mesmo após décadas de compreensão dos mecanismos de geração da dor no homem, muitas dúvidas ainda pairam sobre este fenômeno nos animais (Neto, 2008).

Um dos pontos críticos na avaliação do sofrimento animal é como mensurá-lo, pois um mesmo estímulo doloroso pode desencadear respostas diferentes entre as espécies e mesmo entre indivíduos da mesma espécie e raça (Neto, 2008). Muito se têm falado em avaliação do estresse em sinônimo à avaliação da dor. De fato, a dor é um estímulo estressante, e pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional aversiva, que alerta o indivíduo sobre uma lesão ou ameaça à integridade de seus tecidos. Ela altera o comportamento e a fisiologia do animal tentando evitar ou reduzir o dano tecidual e promover a recuperação (Molony e Kent, 1997).

A dor induz respostas reflexas que resultam no aumento do tônus simpático, vasoconstrição, aumento da resistência vascular sistêmica, aumento da frequência cardíaca e do consumo de oxigênio pelo miocárdio, diminuição do tônus gastrointestinal e urinário, e aumento do músculo esquelético (Mathews, 2005). A resposta endócrina compreende, entre outros, o aumento da secreção de corticotropina, cortisol, hormônio antidiurético, hormônio do crescimento e catecolaminas (Mathews, 2005; Teixeira, 2005). Estes efeitos constituem também a clássica resposta ao estresse e correspondem a uma adaptação desenvolvida para otimizar a sobrevivência no período imediatamente após a injúria (Lamont e Tranquilli, 2000). A dor é considerada um estímulo estressante, mas o contrário não é verdadeiro. Por isso a detecção da dor nos animais pode ser extremamente difícil. Ambos resultam em alterações dos mesmos parâmetros fisiológicos e das determinações bioquímicas.

As mensurações bioquímicas, especialmente o cortisol e a glicose tem se mostrado importantes referências para avaliação da dor e do estresse por meio indireto (Sturion, 2011). Outros parâmetros bastante utilizados são o leucograma de estresse, catecolaminas, proteínas de fase aguda, exame físico, avaliação comportamental e escalas de dor.

Até há pouco tempo, para avaliação da dor nos animais, utilizavam-se de escalas desenvolvidas para o Homem, como a Escala Descritiva Simples, Escalas de Graduação Numérica, e Escalas Visuais Relativas (Mich e Hellyer, 2009). No entanto, segundo Robertson (2006) e Mich e Hellyer (2009), a limitação dessas escalas em medir apenas uma dimensão da dor, como sua intensidade, tornaram-nas inadequadas para o universo da Medicina veterinária, exigindo a criação de escalas multidimensionais ou compostas, como é o caso da Escala de Dor da Universidade de Melbourn (EDUM) e da Escala Composta de Dor de Glasgow. A primeira baseia-se em respostas comportamentais e

fisiológicas específicas, e inclui múltiplas descrições organizadas em seis categorias de parâmetros ou comportamentos relacionados com a dor. Segundo Mich e Hellyer (2009), a escala de Melbourn apresenta uma maior precisão em relação às escalas anteriormente citadas. O seu sistema de pontuação permite realçar o peso relativo de certos comportamentos, e a pontuação total mínima de dor obtida é 0 e a máxima total é 27 (Muir e Gaynor, 2008). A segunda é voltada para avaliação da dor pós-cirúrgica, sendo semelhante à EDUM, mas é realizada em ambiente hospitalar.

A união de vários biomarcadores torna a avaliação mais segura. Além disso, também faz-se importante considerar o histórico do animal (se o mesmo passou por um processo traumático conhecido). A dor pós-operatória, como a observada na orquiectomia por exemplo, é um tipo de dor aguda com etiologia bem definida – o ato operatório, de natureza autolimitante, com pico entre seis a vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, devendo reduzir ou cessar com a cicatrização ou estabilização da área lesada (Gozzani, 2004). Não há relatos na literatura sobre a avaliação do desconforto/dor causado pela castração química por meio da injeção intratesticular de gluconato de zinco em cães.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a seguinte hipótese:

A injeção intratesticular de gluconato de zinco causa desconforto/dor em menor grau que o observado no procedimento convencional da orquiectomia.

Por meio dos seguintes objetivos:

1. Descrever a resposta comportamental ao estresse de animais submetidos à injeção intratesticular de gluconato de zinco e de animais submetidos à orquiectomia
2. Avaliar a concentração de cortisol sérico, glicose sérica e razão neutrófilos/linfócitos de cães submetidos à injeção intratesticular de gluconato de zinco e de cães submetidos à orquiectomia
3. Avaliar o grau de sensibilidade dos parâmetros observados, relacionados ao estresse de cães submetidos à injeção intratesticular de gluconato de zinco e à orquiectomia.

3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AIUDI G, SILVESTRE F, LEOCI R, LACALANDRA GM. **Single testicular injection Chlorhexidine solution as a chemical sterilant in dogs.** In: International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control, 4, 2010, Dallas, TX. *Proceedings ...* Dallas, TX: ACC & D, 2010.
- ALMEIDA, T. P. *et al.* **Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária – revisão de literatura.** *Veterinária em Foco*, v. 3, n. 2, p. 107:18, 2006.
- AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F. **Dinâmica populacional canina:** Anon. FDA approves first injectable solution for dog sterilization. *FDA Consumer*; 2003. p. 3.
- ASA, C.S. **Types of contraception: the choices.** In: ASA, C.S.; PORTON, I.J. (Ed.). *Wildlife contraception.* Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2005. P. 29-52.
- BAKER HJ. **Immunization of cats and dogs with an anti-GnRH protein vaccine with molecular adjuvantation.** *In:* International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control. 2, 2004, Breckenridge, CO. Breckenridge, CO: ACC & D, 2004.
- BARAN A, OZDAS OB, GULCUBUK A, HAMZAOGLU AI, TONGUC M. **Pilot study: intratesticular injection induces sterility in male cats.** In: International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control. 4, 2010, Dallas, TX. *Proceedings ...* Dallas, Texas: ACC & D, 2010.
- BOOTHE, H. W. **Testes and epididymides.** In: SLATTER D, editor. *Textbook of small animal surgery.* USA: Elsevier Science, p. 1527–9, 2003.
- BOWEN, RA - **Male contraceptive technology for nonhuman male mammals -** *Animal Reproduction Science* 105 (2008) 139–143.
- BRADLEY MP, EADE J, PENHALE J, BIRD P. **Vaccines for fertility regulation of wild and domestic species.** *J Biotechnol* 1999; 73:91–101.
- BRUNETTO, M. A. *et al.* **Correspondência entre obesidade e hiperlipidemia em cães.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 266-271, 2011.
- CEDILLO, VG; VARGAS, PF; MONROY, OV - **Results of the massive sterilization project using gluconate neutralized with arginine in male dogs living in the States of Hidalgo, Mexico and Puebla.** *In:* *Proceedings of the XVII Rabies in the*

- Americas (RITA), 2006, Brasília, DF, Brazil. Brasília: Editora do Ministério da Saúde. p.15-20.
- CHRISTENSEN GC: **The urogenital apparatus**. In: Miller's anatomy of dog. Edited by: H E Evans HE, Christensen GC. WB Saunders Company: Philadelphia; 1979:544-601.
- DUNCAN, I. J. H. **Science-based assessment of animal welfare: farm animals**. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., v. 24, n. 2, p. 483-492, 2005.
- ENGLAND GCW. **Effect of progestogens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs**. J. Reprod. Fertil., Suppl. 51, p. 123-138, 1997. CO. Breckenridge, CO: ACC & D, 2004. Session II: Contraceptive Vaccines p.96-98.
- FAHIM MS, WANG M, SUTCU MF, FAHIM Z, YOUNGQUIST RS. **Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine**. *Contraception*, v.47, p.107-22, 1993.
- FRANÇA, LR.; PARREIRA, G.G.; GATES, R.J. et al. **Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomy**. *J. Androl.*, v.19, p.335-342, 1998b.
- FRESHMAN JL, OLSON PN, AMANN RP, et al. **The effects of methyltestosterone on reproductive function in male greyhounds**. *Theriogenology* 1990;33:1057-73.
- GERMAN, A. J. **The growing problem of obesity in dogs and cats**. *Journal of Nutrition*, v. 136, n. 7, p. 1940-1946, 2006.
- GOZZANI J.L. **Analgesia pós-operatória**. In: Manica J. Anestesiologia. Princípios e Técnicas. 3ª Ed. São Paulo: Artmed; 2004.p.763-769.
- HOWE, L. M. **Surgical methods of contraception and sterilization**. *Theriogenology*, v.66, n.3, p.500-509, 2006.
- IMMEGART HI, THRELFALL WR. **Evaluation of intratesticular injection of glycerol for nonsurgical sterilization of dogs**. *Am J Vet Res* , v.61, p.544 - 549, 2000
- JANA K, SAMANTA PK, GHOSH D. **Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization of male Black Bengal goats (*Capra hircus*): a dose-dependent study**. *Animal Reproduction Science* 86: 89-108, 2005.

- JANA K, SAMANTA PK. **Clinical evaluation of non surgical sterilization of male cats with single intratesticular injection of calcium chloride.** BMC Veterinary Research 2011. Available on: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/7/39>. Accessed: on October 21 2011.
- JANA K, SAMANTA PK. **Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for non-surgical sterilization in adult albino rats.** Contraception 2006, 73:289-300.
- JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline theriogenology.** Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. 592 p.
- KUSTRITZ, M.V. **Reproductive behavior of small animals.** Theriogenology 64 (2005) 734–746
- KUTZLER M, WOOD A: **Non-surgical methods of contraception and sterilization.** Theriogenology, 2006, 66 :524-525
- LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J. **Physiology of Pain.** The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice. Philadelphia:Saunders, v.30, n.4, p. 703-728, 2000.
- LEONARD, A; GERBER, GB; LEONARD, F. **Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc.** *Mutat Res.*, v.168, p.343-348, 1987.
- LEVY JK, MILLER LA, CRAWFORD PC, et al. **GnRH immunocontraception of male cats.** Theriogenology 2004;62:1116–30.
- MASCARENHAS, NMF; HILST, CLS; SOUZA, MSB; MARTINS, MIM; PIROLO, J; NABUT, LB ; MACHADO, MA; NAVARRO, IT; FRÜHVALD, E; ZANONI, FP; TOKIOSHI, AF ; LACERDA, LCC - **Posse responsável e controle populacional de cães e gatos e sua contribuição para a redução da eutanásia na população errante de Londrina e região.** In: Anais do 35° Conbravet, Gramado, RS. p.706-9, 2008.
- MATHEWS, K. A. **Dor: origem e efeito.** In: RABELO, R. C.; CROWE JR, D. T. Fundamentos de terapia intensiva veterinária em pequenos animais – Condutas no paciente crítico. Rio de Janeiro: L F livros, 2005. p. 519-527.
- MICH e HELLYER. (2009). **Objective, Categoriic Methods for Assessing Pain and Analgesia.** In W. W. Muir III & J. S. Gaynor (Eds.), *Handbook of Pain management* (pp. 78-109). St. Louis: Mosby.

- MOLONY, V., KENT, J. E. **Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements.** *J. Anim. Sci.* v.75, p.266–272, 1997.
- MUIR WW III, GAYNOR JS (2008). **Pain Behaviors.** In: Gaynor Js, Muir WW III, (ed). *Handbook of veterinary pain management.* St Louis: Mosby: 62-77.
- MULLER, P.M; OLIVEIRA, E.C.S; SILVA, F.L.M; SILVA, L.G; CARVALHO, D.S; FAGUNDES, A.K.F; MELO, S.K.M. **Castração química de cães machos – Aspectos clínicos, bioquímicos, reprodutivos e comportamentais.** X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX 2010. UFRPE. 18 a 22 de Outubro.
- NASSAR R, FLUKE J. **Pet population dynamics and community planning for animal welfare and animal control.** *JAVMA.* 1991; 198(7):1160-4.
- NETO, P.I.N. **Dor, sensibilidade e bem-estar em animais.** *Ciênc. vet. trop.*, Recife-PE, v. 11, suplemento 1, p. 26 -30 abril, 2008.
- NISHIMURA N, KAWATE N, SAWADA T, MORI J. **Chemical castration by single intratesticular injection of lactic acid in rats and dogs.** *J Reprod Dev,* v.38, p.263-266, 1992.
- OLIVEIRA ECS, MOURA MR, SÁ MJC, SILVA JR VA, KASTELIC JP, DOUGLAS RH, MARQUES JR AP. **Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a zinc gluconate-based solution.** *Theriogenology.* 2012.
- OLIVEIRA ECS, MOURA MR, SILVA JR. VA, PEIXOTO CA, SARAIVA KL, SÁ MJ, DOUGLAS RH, DE PINHO MARQUES JR AP. **Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs.** *Theriogenology,* v.68, p.137-145, 2007
- PAULA, P. M. C. **Estratégias adicionais no controle populacional de cães de rua.** 2010. 72f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Curitiba.
- PINEDA MH, DOOLEY MS. **Surgical and chemical vasectomy in the cat.** *Am J Vet Res,* v.45, p.291-300, 1984.
- PINEDA, AMH, REIMERS TJ, FAULKNER LC, HOPWOOD ML, SEIDEL GE JR. **Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides.** *Am J Vet Res,* v.38, p.831-838, 1977.

- PURSWELL BJ, JOCHLE W. **Targets and historical approaches to non-surgical sterilization in dogs and cats.** The Fourth International Symposium on Non-Surgical Methods for Pet Population Control. 2010, p. 84–8.
- ROBBINS S. **Possible mechanism for the breaking of self-tolerance and achieving sustained immunoneutralization of GnRH in male and female cats.** In: International
- ROBERTSON S.(2006). **A Review of opioid use in cats** In *Gleed RD, Ludders JW, eds.Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Companion Animals.* Ithaca, New York USA: International Information Service Acedido em dec. 26, 2008, disponível em: www.IVIS.org.
- RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, J. L. **Alternativas contraceptivas em caninos e felinos domésticos.** In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia. Anais... Goiânia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005. p.1-12.
- SCHIFF JD, LI PS, SCHLEGEL PN, et al. **Rapid disappearance of spermatozoa after vassal occlusion in the dog.** J Androl 2003;24:361–3
- SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery.** 3. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2003. v.2, 1427p.
- SOTO FRM, VIANA WG, MUCCIOLO GCB, HOSOMI FYM, VANUCCHI CI, MAZZEI CP, EYHERABIDE AR, DE FÁTIMA LUCIO C, DIAS RA, AZEVEDO SS. **Evaluation of efficacy and safety of zinc gluconato associated with dimethyl sulphoxide for sexually mature canine males chemical neutering.** Reprod Dom Anim 2009;44:927-31.
- SOTO FRM, VIANA WG, SOUSA AJ, PINHEIRO SR, MUCCIOLO GB, HOSOMI FYM, AZEVEDO SS, DIAS RA, 2007: **Evaluation of zinc gluconate, either associated or not to dimethyl sulfoxide, as contraceptive method for male dogs.** J Anim Reprod 4, 119–124.
- STOCHE, R. M.; GARCIA, L. V.; KLAMT, J. G. **Anestesia e resposta neuroendócrina e humoral ao estresse cirúrgico.** Revista Brasileira de Anestesiologia,v.51, n.1, p. 59 – 69, 2001.
- STURION, A.L.T. **Cortisol, glicose e triglicérido na avaliação do estresse neuroendócrino de cães com fratura tibial.** 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Rio Grande do Sul.

- Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control. 2, 2004, Breckenridge, CO Breckenridge, CO: ACC & D
- TEIXEIRA, M. W. **Dor em pequenos animais**. Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária, n. 34, p. 31-40. 2005.
- TEPSUMETHANON V, WILDE H, HEMACHUDHA T. **Intratesticular injection of a balanced zinc solution for permanent sterilization of dogs**. J Med Assoc Thailand 2005;88:686-9.
- WANG M. **Neutersol: from laboratory to market**. In: Second International Symposium on Non-surgical Methods for Pet Population Control; 2004, p.165-9.
- WANG, M. **Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs**. In: Proceedings of the 2002 International Symposium on nonsurgical methods for pet population control. p.62-65, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. World Society for the Protection of Animals -WSPA. **Guidelines for dog population management**. Geneva; 1990. p. 116.

CAPÍTULO 2

ARTIGO 1

Marcadores de estresse em cães

Stress biomarkers in dogs

Adriana Neves, Thais Ferraz, Cibele Melo, Erika Oliveira

-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA-

RESUMO

Os cães assumiram um papel muito importante na evolução humana, e hoje ocupam um espaço na sociedade, sendo muitas vezes considerados membros da família. Sendo assim, existe uma preocupação crescente no que diz respeito ao bem estar animal. O estresse tem sido empregado como o principal indicador e mecanismo de avaliação do bem-estar. O presente trabalho tem como objetivo explorar algumas formas de avaliação do estresse, quais parâmetros são potencialmente úteis e que formas não invasivas tem sido utilizadas para auxiliar na identificação do estresse e dor em cães.

Palavras-chave: *Canis lupus familiaris*, bem estar, biomarcadores

ABSTRACT

Dogs have taken a very important role in human evolution, and today occupy a place in society, often considered family members. Thus, there is a growing concern with regard to animal welfare. Stress has been used as the main indicator, and also as a mechanism, for welfare evaluation. This study aims to explore some forms of stress assessment, which parameters are potentially useful and, finally, noninvasive forms that have been used to assist in identifying the stress and pain in dogs.

Key words: *Canis lupus familiaris*, welfare, biomarkers

INTRODUÇÃO

No Brasil, assim como em outros países, devido à relação estabelecida entre o cão e o ser humano, existe uma preocupação crescente com o bem-estar animal. Desde que os animais são considerados seres sencientes, capazes de experimentar dor e sofrimento,

existe o interesse em evitar e minimizar essas sensações. Segundo a Farm Animal Welfare Advisory Council (FAWAC), o conceito de bem-estar refere-se a uma boa ou satisfatória qualidade de vida, que envolve vários aspectos referentes ao animal, devendo-se ter como base as cinco liberdades por ela divulgadas em 1967, onde todo animal deve estar livre de fome e sede; livre de desconforto; livre de dor, lesões ou doenças; livre para expressar seu comportamento normal; e livre de medo e estresse. Em resumo, o animal deve estar em boas condições físicas e mentais. Com efeito, o estresse tem sido empregado como o principal indicador e mecanismo de avaliação do bem-estar.

Para uma avaliação válida de estresse, é preciso saber como ele se manifesta e como pode ser medido. Muitos estudos publicados nos últimos anos sobre bem-estar em animais domésticos e de laboratório demonstram o crescente interesse por esta questão, no entanto esses estudos, em sua maioria, são voltados para a compreensão do estresse em situações específicas. A presente revisão tem como objetivo explorar algumas formas de avaliação do estresse, quais parâmetros são potencialmente úteis e que formas não invasivas tem sido utilizadas para auxiliar na identificação do estresse e dor em cães.

O mecanismo de ação e reação do estresse

A resposta ao estresse tem como finalidade manter e/ou restaurar a homeostase do organismo lesado, mantendo a estabilidade hemodinâmica, preservação do aporte de oxigênio para tecidos nobres, mobilização de substrato calórico, redução de efeitos dolorosos e manutenção de temperatura corpórea (STOCHE et al., 2001). Essa resposta se inicia no sistema nervoso central, ao perceber uma potencial ameaça à homeostase, gerando alterações biológicas significativas nos animais, que consistem em quatro defesas gerais: a resposta comportamental, a resposta do sistema nervoso autônomo, a neuroendócrina e a do sistema imunológico (MOBERG e MENCH, 2000). Cada resposta dessas gera informações que possibilitam avaliar a presença ou não do estresse.

Resposta comportamental

A resposta comportamental muitas vezes é a melhor maneira que o animal tem para lidar prontamente com o fator estressante. Alguns comportamentos que o cão exhibe durante a resposta ao estresse, como a forma de comunicação, podem fornecer uma medida do seu estado interno e então serem úteis como medidores de estresse (MOBERG e MENCH, 2000). A análise comportamental para avaliação do estresse em cães tem sido utilizada rotineiramente nas últimas décadas. Estados de movimento, posturas corporais, vocalizações, comportamentos orais, comportamentos comunicativos e exploratórios, têm sido usados como indicadores de condições de bem-estar (HORVATH et al, 2007; HAVERBEKE et al, 2008). Esta observação é considerada um meio de diagnóstico promissor e não invasivo, podendo ser usado para quantificar a intensidade da dor e as suas associações a fatores como o stress (MUIR, 2008). Uma variedade de respostas comportamentais tem sido relatada em cães submetidos a diferentes tipos de estresse. Parte desta diversidade pode ser atribuída às diferenças nos protocolos utilizados por diferentes investigadores.

A avaliação do comportamento normalmente é realizada por especialistas, mas SERPELL e HSU (2001) sugerem que metodologias que aplicam questionários com os tutores dos animais têm uma potencial aplicabilidade para medir o comportamento em situações em que outros meios convencionais sejam difíceis de utilizar, baseando-se no fato de que os donos conhecem o comportamento dos seus cães melhor do que ninguém. Num estudo realizado por MARITI et al (2012), sobre a percepção do estresse em cães por seus proprietários, observou-se que mais da metade dos entrevistados foram capazes de identificar corretamente o estresse como alteração a curto ou longo prazo do equilíbrio psicofísico que pode evoluir para doença; os autores destacaram ainda que essa capacidade foi maior nas pessoas com níveis educacionais mais elevados.

No entanto, a avaliação comportamental nem sempre é um método confiável, pois pode ser influenciada pela subjetividade do observador, seja proprietário ou especialista, bem como pela variabilidade do indivíduo. Na verdade, os potenciais fatores de estresse podem desencadear respostas diferentes, como resultado das diferenças individuais, tais como a capacidade de certos animais para lidar com um determinado contexto (APPLEBY e HUGHES, 1998). Além disso, o tipo de estímulo e as respostas relacionadas dependem de diversas variáveis, incluindo genética, experiências no início

da vida, e o sucesso ou o fracasso das respostas anteriores ao estresse (HORWITZ, 2004). Sendo assim, o ideal é que estejam sempre associados à avaliação comportamental, outros parâmetros fisiológicos utilizados como marcadores de estresse (PASTORE et al., 2011).

Resposta do Sistema Nervoso Autônomo

A ativação do SNA se dá alguns segundos após a recepção do estímulo estressor, através de um sinal enviado pelo hipotálamo, via sistema nervoso, para a medula adrenal. Isso é possível devido ao aumento na secreção das catecolaminas, como a norepinefrina e a epinefrina, neurotransmissores responsáveis pelo controle das respostas vegetativas de alerta do organismo (ULHÔA, 2009). Suas ações envolvem a regulação do metabolismo intermediário bem como as respostas que permitem que os animais se ajustem a situações que envolvem o estresse agudo (CUNNINGHAM, 2004).

Em resposta a estímulos agudos aversivos, as catecolaminas são liberadas em poucos segundos por terminações nervosas simpáticas periféricas e pelas glândulas supra-renais, estimulando a mobilização de glicogênio, e resultando na liberação de glicose e lactato, que por sua vez podem ser medidos no plasma e serem usados como marcadores indiretos da ativação simpática (PRUNIER et al, 2005).

Além do aumento de catecolaminas no soro, pode-se observar aumento da glicose no soro, da frequência cardíaca e pressão sanguínea. BEERDA (1997) avaliou a resposta de FC em cães após diferentes estímulos de estresse e relatou que essa resposta ocorreu de forma inespecífica para todos os tipos de estímulos, e que não forneceu nenhum conhecimento a respeito de que os comportamentos foram, em particular, indicativos de estresse.

Respostas do SNA, como taquicardia, taquipnéia, aumento da pressão arterial, arritmias, salivação, midríase, sudorese e liberação de catecolaminas são indicativos de dor e estresse, principalmente quando estão associadas às alterações do comportamento. Devido à rápida e específica resposta do SNA a determinados agentes estressores, as avaliações acima podem ser utilizadas na avaliação do estresse, no entanto, devido à fugaz resposta desses parâmetros, essas mensurações mostram-se difíceis e pouco

confiáveis (SACKMAN, 1991). MOBERG e MENCH (2000) relatam que estas variações representam boas ferramentas para avaliar a magnitude de uma resposta aguda, mas elas não são precisas para avaliação em longo prazo, e que este aspecto, juntamente com a dificuldade em avaliar os parâmetros como pressão arterial ou da frequência cardíaca no campo, torna a resposta do SNA de menor interesse na avaliação do estresse.

Resposta neuroendócrina

A resposta endócrina é ativada por estímulos neuronais a partir do local da lesão tecidual. O impulso viaja através das vias neuronais até o hipotálamo. Após a sensibilização do hipotálamo, este libera o fator liberador de corticotropina (CRF), que é transportado até a hipófise, onde ativa a secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A hipófise libera uma grande quantidade de ACTH para a corrente sanguínea, tendo como sitio de ação as células presentes na zona fasciculada das adrenais (YEAGER et al., 2004), que após a sensibilização aumentam o número de receptores para captação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e colesterol da circulação sanguínea, essenciais para produção de esteroides (GUYTON e HALL, 2006).

No estresse, além da secreção do ACTH, a hipófise aumenta também a produção de outros hormônios, tais como a vasopressina (VP), prolactina (PRL), hormônio do crescimento (GH) e o hormônio estimulador da tireóide (TSH). Sendo assim, o estresse acaba por envolver todo o organismo no esforço de adaptação (BALLONE e MOURA, 2008).

Cortisol

O cortisol é um glicocorticoide produzido pela glândula suprarrenal, essencial nos mecanismos de resposta ao estresse. Desempenha também um importante papel na regulação do sistema imune e do metabolismo de proteínas, carboidratos e gorduras (CUNNINGHAM, 2004). É um biomarcador comumente utilizado para avaliação de estresse em cães (HAVERBEKE et al, 2008), pois oferece a vantagem de ser um indicador sensível e universalmente aceito, e de fácil mensuração através de kits comerciais.

Os hormônios esteroides são lipídeos, e dependem da ligação com proteínas plasmáticas para o transporte no sangue. Aproximadamente 75% do cortisol transportado no plasma está ligado à transcortina, globulina específica com alta afinidade ao cortisol, e 15% à albumina, permanecendo 10% no estado livre (CUNNINGHAM, 2004). Porém o cortisol só apresenta ação fisiológica quando circulando em forma livre. Esta conjugação do cortisol com proteínas plasmáticas serve como reservatório para diminuir rápidas flutuações nas concentrações de forma livre, também pode ajudar a garantir uma distribuição relativamente uniforme do hormônio nos tecidos (ANTI et al, 2008). Alterações no estado fisiológico ou fisiopatológico podem influenciar a quantidade de proteínas ligadoras presentes no plasma, assim, as concentrações presentes não somente refletem a taxa de secreção, mas também podem ser influenciadas pela quantidade de proteínas plasmáticas ligadoras de glicocorticoides (CUNNINGHAM, 2004). Além disso, concentrações circulantes de glicocorticóides apresentam uma oscilação circadiana, com concentrações mais elevadas na parte da manhã em cães (BEERDA et al., 1999).

Os níveis de cortisol são frequentemente mensurados no plasma, porém existem outros métodos menos invasivos, como cortisol livre na urina, na saliva, fezes ou cabelo. Vários estudos têm sugerido que a técnica de coleta da amostra de cortisol por si só pode causar aumento no seu nível, por isso busca-se técnicas de coleta minimamente invasivas, defendidas como menos estressantes.

O cortisol urinário tem sido amplamente utilizado como um indicador de estresse (BEERDA et al., 2000; STEPHEN e LEDGER, 2006; ROONEY e BRADSHAW, 2007), e é expresso em relação à creatinina para corrigir a diluição da urina. A dosagem de cortisol livre na urina apresenta como vantagem teórica o fato de ser imune a flutuações da proteína carregadora de cortisol, por outro lado, apresenta uma limitação específica que concerne à coleta da urina, procedimento que exige participação ativa do paciente (VIEIRA et al., 2005).

STEPHEN e LEDGER (2006), avaliando cortisol urinário em cães de canil, encontraram uma média de cortisol:creatinina urinário de $17,8 \times 10^{-6}$, valor ligeiramente superior ao relatado por BEERDA et al (2000) em cães que vivem em diferentes condições de canil ($4,8 - 14,4 \times 10^{-6}$), e sugerem que esta disparidade pode ser por diferenças em técnicas de amostragem ou medição, ou por diferenças nos temperamentos dos cães.

A concentração de cortisol plasmático tem sido muito utilizada para medir estresse e dor induzida após cirurgias em cães, sendo uma desvantagem da sua medição, o tempo de contenção necessário para coleta de sangue, que pode ser um fator estressante por si só (BEERDA et al., 1996). HENNESSY et al. (1998) observaram um aumento nos níveis de cortisol 20 minutos depois de um procedimento de punção da veia, o que foi atribuído aos cães do abrigo desacostumados à coleta de sangue. Da mesma forma, KOBELT et al. (2003) relataram aumento de cortisol plasmático três minutos após a coleta de sangue, e aumento do cortisol salivar quatro minutos após a coleta de saliva em cães. Visto que os cães podem aprender a prever a coleta de sangue e saliva, estas alterações de cortisol podem ocorrer antes mesmo da coleta da amostra.

Estas limitações muitas vezes podem ser superadas pelo uso de amostras de saliva. A principal vantagem deste método é que não é invasivo e é agora amplamente usado na medição do estresse em estudos sobre animais (BEERDA et al., 1996, 1998, 2000). As concentrações de cortisol na saliva foram bem correlacionadas com as concentrações plasmáticas em várias espécies, incluindo humanos (KIRSCHBAUM e HELLHAMMER, 1989) e cães (VINCENT e MICHELL, 1992; BEERDA et al, 1996).

O cortisol salivar mostrou ser uma medida não-invasiva e útil tanto no estresse agudo (BEERDA et al, 1998) quanto no crônico (BEERDA et al, 1999, 2000) em cães.

HEKMAN et al, (2012), estudando o comportamento e as concentrações de cortisol salivar em uma população de cães saudáveis hospitalizados para procedimentos eletivos, observaram concentrações salivares de cortisol significativamente mais elevadas do que o resto da população estudada e mostraram correlações apenas modestas de determinadas frequências comportamentais com o cortisol, como “descanso de cabeça”, “respiração ofegante” e “lambadura dos lábios”; já PASTORE et al. (2011), avaliando a ocorrência de mudanças comportamentais estresse-dependentes em cães agility, encontraram comportamentos atribuíveis ao estresse, como inquietude, tremores, respiração ofegante e abano da cauda, juntamente com elevação de cortisol salivar após a prova de agility, sem encontrar, porém, correlação deste com o comportamento.

Glicose

Dentre os efeitos metabólicos mais amplamente conhecidos do cortisol e de outros glicocorticoides, está a sua capacidade de estimular a gliconeogênese pelo fígado

(GUYTON e HALL, 2006). Durante uma situação de estresse, tanto o aumento do cortisol, quanto das catecolaminas, resultam no aumento da glicose plasmática, que pode também ser utilizada como um biomarcador para avaliar a resposta do eixo HPA ao estresse. No entanto, como este metabólito também é influenciado pela resposta do SNA e de outros fatores, como alimentação e fome, não é tão confiável quanto o cortisol, ainda assim, sua utilização em conjunto com a determinação do cortisol pode dar apoio adicional para avaliação do eixo HPA ao estresse.

Prolactina

A prolactina tem a sua síntese e secreção adeno-hipofisária reguladas principalmente pelo hipotálamo, e desempenha mais de 300 diferentes funções biológicas, entre elas, parece estar implicada na resposta de adaptação ao estresse, além de aumentar a imunidade humoral e celular (CORONHO et al., 2001).

Apesar de a prolactina ter sido amplamente utilizada em outros animais e seres humanos para avaliação do estresse, poucos estudos têm sido publicados sobre o uso de prolactina como biomarcador de estresse em cães. A prolactina no cão está envolvida em respostas emocionais e aumenta durante interações positivas com os seres humanos. Hiperprolactinemia foi encontrada em cães com ansiedade generalizada, mas não em cães com fobias ou ansiedade leve (PAGEAT et al, 2007).

Dependendo do meio ambiente regulador local, no momento da tensão, o nível de prolactina pode aumentar ou diminuir. A vasopressina e o peptídeo histidina-metionina (PHM) podem estar envolvidos na secreção de prolactina durante o estresse, no entanto, o significado real da alteração do nível de prolactina é incerto. Sabe-se que pode afetar o sistema imunológico ou algum aspecto da homeostase (ITOH et al., 1983).

Hormônios da tireoide

Apesar do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (HHT) não ter sido extensivamente estudado em relação ao estresse, evidências crescentes indicam que os hormônios da tireóide também participam da resposta ao estresse crônico (CREMASCHI et al., 2000; SILBERMAN et al., 2002).

A secreção dos hormônios tireoidianos é regulada à distância pelo hipotálamo, a mesma região cerebral que é mobilizada desde o início do estresse. O hipotálamo produz Hormônio Liberador de Tireotropina (TRH), o qual, chegando à hipófise,

estimula a produção do Hormônio Estimulador da Tireóide (TSH). O TSH hipofisário, por sua vez, age na tireoide estimulando a produção de tiroxina (T4), hormônio tireoidiano.

As alterações do hipotálamo durante o estresse e, conseqüentemente, as alterações da hipófise, podem resultar em desordem na produção da tiroxina. Tanto pode ocorrer um excesso como uma deficiência de tiroxina, provocando respectivamente o hiper e o hipotireoidismo. Na fase aguda do estresse é comum o hipertireoidismo e na fase crônica, o hipotireoidismo, embora essas alterações possam acontecer inversamente (BALLONE e MOURA, 2008). Segundo HELMREICH et al. (2005), as funções da tireóide são geralmente reprimidas durante condições estressantes. Sendo assim, os hormônios da tireoide não são bons parâmetros para avaliação da dor ou estresse.

Hormônio do crescimento (GH)

O nível do GH é aumentado durante o esforço físico agudo, podendo aumentar em até duas a dez vezes. Devido ao seu efeito antagônico à insulina, o GH pode aumentar a atividade metabólica. Em estresse psicológico, no entanto, as respostas de GH são raramente vistas. Pelo contrário, existe um defeito de secreção de GH com o estresse psicossocial prolongado (SKUSE et al., 1996), logo não parece ser um bom marcador de estresse.

Resposta imune

A resposta do sistema imune durante o estresse foi classicamente relacionada com a resposta do eixo HPA e ao aumento de glicocorticoides circulantes, que causa supressão da competência imune. No entanto, o sistema imune é atualmente considerado como tendo a sua própria resposta primária para um fator estressante. A resposta imune pode ser avaliada de uma forma simples e clinicamente útil usando contagem total e diferencial de glóbulos brancos (ALLEVA et al., 2003).

Os corticosteroides, exógenos ou endógenos, quando apresentam sua secreção aumentada, causam alterações no leucograma, mais previsível para cães e gatos, e menos para equinos e bovinos. O leucograma de estresse é classicamente caracterizado por neutrofilia, linfopenia, eosinopenia e monocitose. O cão demonstra esta resposta leucocitária com maior consistência e o gato, por sua vez, ocasionalmente apresenta uma monocitose (MEYER et al., 1995).

Os neutrófilos e linfócitos têm sido utilizados em seres humanos e cavalos para avaliar o estresse pós-operatório, e sua razão tem sido proposta como um indicador útil e barato de estresse perioperatório. Alterações nos neutrófilos e linfócitos estão principalmente relacionados com a inflamação pós-operatória e com a ativação do eixo HPA durante o estresse perioperatório. No entanto, a dor pós-operatória também foi encontrada como responsável por apoptose de linfócitos (ALLEVA et al., 2003).

Segundo BUSH (2004) existem alterações nos eosinófilos, de acordo com o tipo de estresse, onde a liberação de adrenalina causada no estresse agudo por medo, excitação ou atividade muscular violenta, por exemplo, causa, primeiramente, leve eosinofilia, seguida de um pico moderado de eosinopenia depois de aproximadamente quatro horas. No estresse crônico, há liberação de glicocorticoide endógeno (principalmente cortisol) que causa eosinopenia com neutrofilia, linfopenia e monocitose (BUSH, 2004).

Além das alterações nos glóbulos brancos, durante uma infecção, inflamação ou mesmo estresse, o organismo animal desenvolve um conjunto de alterações denominado de “resposta de fase aguda”, que tem sido relacionado com o eixo HPA (DINARELLO, 1984), e envolvem mudanças nas funções metabólicas, endócrinas, neurológicas, imunológicas e alterações nos níveis de algumas proteínas plasmáticas (DABROWSKI et al, 2007). As proteínas de fase aguda (APPs) são um grupo de proteínas produzidas no fígado após estimulação por citocinas pró-inflamatórias e liberadas para a corrente sanguínea. São consideradas componentes da imunidade inata, não específicas, envolvidas na restauração da homeostase (CERON, 2005). Quando o animal é submetido a desafios externos ou internos, tais como infecções, traumas, cirurgias ou estresse, essas proteínas podem aumentar sua concentração no sangue (APPs positivas) ou diminuir (APPs negativas). Vários trabalhos científicos indicam como principais proteínas de fase aguda, a proteína amilóide sérica (PAS), a proteína C reativa (PCR), o fibrinogênio, a proteína ligante de manose (PLM), a haptoglobina (Hp), a ceruloplasmina (Cp), a α -1- antitripsina e a α -1-glicoproteína sérica. Dessas proteínas, as mais investigadas na medicina veterinária são as PCR em cães, a α -1-glicoproteína e a Hp em felinos, a Hp e PCR em ruminantes e Hp em suínos (YAMAMOTO et al., 1992). Estas proteínas foram consideradas indicadores potenciais de doença e bem-estar em animais, individualmente, bem como da saúde do rebanho (MURATA et al., 2004).

Em geral um aumento significativo em APPs no soro é detectável entre quatro e 24 horas após uma lesão, e o pico de concentração máxima é atingindo entre 24 horas e

sete dias. Em trauma cirúrgico, um aumento significativo é detectável entre quatro e 24 horas, e um pico é alcançado entre 24 horas e quatro dias, sendo a PCR detectada mais rapidamente (SIRACUSA, 2009).

Proteína C-reativa

A PCR é uma proteína de fase aguda não específica, que aumenta na presença de inflamação (HAYASHI et al, 2001), além disso tem um papel importante na proteção contra processos infecciosos, eliminação de tecidos alterados e prevenção de reações de autoimunidade (MOLD et al., 2002).

A PCR canina pode ser detectada a partir de várias amostras, sendo a mais frequente o sangue venoso. PARRA et al. (2005) sugere a utilização da saliva, como um método de amostragem mais fácil e menos estressante para o animal.

Devido à sua cinética rápida, à sua fácil interpretação, boa sensibilidade e ao elevado intervalo de valores, a PCR pode ser utilizada para diagnóstico, por si só ou em associação com outros parâmetros (ARCHER, 2008). OTABE et al. (1998) realizaram um estudo cujo objetivo era avaliar se as concentrações de PCR variavam ao longo de 24 horas ou de quatro semanas, e os resultados obtidos foram constantes, indicando que a concentração desta proteína não varia ao longo do dia nem do mês.

Em 1993, YAMAMOTO et al. demonstraram que a PCR canina é antigenicamente diferente da PCR humana, não se podendo utilizar testes desenvolvidos para humanos na determinação das concentrações de PCR canina, no entanto, KLENNER et al. (2010), avaliaram três ensaios turbidimétricos automatizados (Randox, Thermo e Wako), desenvolvidos para os seres humanos, quanto à sua capacidade de detectar o PCR canino, e demonstram que dois dos três testes (Randox e Wako) apresentaram reatividade cruzada com PCR canino e, assim, poderiam ser utilizados para detectar um aumento na concentração de PCR de cães com neoplasia ou inflamação. Além disso, outros estudos têm sido realizados utilizando ensaios de PCR humanos para avaliação em cães (CARVALHO et al., 2008; WONG et al., 2011).

Haptoglobina

A haptoglobina é uma glicoproteína plasmática sintetizada principalmente pelo fígado com atividade antioxidante e imunomoduladora, sendo sua principal função a formação de um complexo estável com a hemoglobina livre liberada no interior dos

vasos sanguíneos prevenindo desta forma a excreção de ferro pelos rins e os danos causados pelo efeito oxidativo do ferro ao permanecer livre (MELAMEDFRANK et al., 2001). A concentração de haptoglobina aumenta em processos inflamatórios agudos, estresse e, às vezes, durante processos neoplásicos recentes (CORAZZA, 1997). Um aumento para haptoglobina sérica em cães foi observado, com um pico entre três a quatro dias após procedimento cirúrgico (CERON, 2005).

Imunoglobulina A (IgA)

A Imunoglobulina A salivar (sIgA) desempenha um importante papel na imunidade mucosa e foi comprovada como um marcador objetivo e sensível de estresse em seres humanos (RING et al., 2002). SKANDAKUMAR et al. (1995) em seu trabalho, relatam que o IgA salivar pode ser um marcador útil para medir o bem estar em cães, e que o mesmo diminui seu nível como resultado de tensão nesses animais. As amostras de saliva são facilmente obtidas sem causar sofrimento para os indivíduos, e um pequeno volume da amostra é suficiente. KIKKAWA et al. (2003) também sugerem o sIgA como um marcador útil de estresse em cães.

CONCLUSÃO

A modulação da resposta ao estresse é altamente variável, e depende da experiência individual, do grau do estímulo estressor, da idade e da forma como o cão se relaciona com o ambiente, entre outros fatores. Nem sempre os quatro sistemas que vimos são ativados simultaneamente, e cada um deles pode responder a um grau diferente quando ativado. Nenhum dos parâmetros acima discutidos é específico para avaliação do estresse, embora o cortisol seja considerado bastante sensível e universalmente aceito para este propósito. Já outros parâmetros como hormônio do crescimento, prolactina e tiroxina, apesar de apresentarem alteração durante um estímulo estressante não são muito utilizados por sua grande variação. Mais estudos devem ser realizados nessa área para que se possa estabelecer exatamente qual o papel desses hormônios no estresse e a sua confiabilidade como biomarcador.

É importante levar em consideração o tipo de estressor ao que o animal será submetido, o tempo de estímulo, o tipo de amostra a se coletar e a manipulação do animal, além de se associar mais de um parâmetro, para que se minimizem as influências externas e a avaliação seja mais próxima da realidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEVA, R.; TOMASETTI, M.; SOLENGHI, M.D.; STAGNI, F.; GAMBERINI, F.; BASSI, A.; FORNASARI, P.M.; FANELLI, G.; BORGHI, B. Lymphocyte DNA damage precedes DNA repair or cell death orthopaedic surgery under general anaesthesia. **Mutagenesis** 18(5): 423-428, 2003.
- ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticoides. **Einstein**, v. 6, supl. 1, p. 159 – 165, 2008.
- APPLEBY, M.C.; HUGHES, B.O. Understanding animal welfare. **CABI Publishing**, Wallingford, UK. 1998.
- ARCHER CCA. **Relevância da determinação de proteína C reativa em cirurgia – Estudo preliminar no cão**. 2008. 81f. (Mestrado Integrado em Medicina veterinária), Universidade Técnica de Lisboa.
- BALLONE, G.J.; MOURA, E.C. *Alterações Hormonais no Estresse* - in. PsiqWeb, Internet, disponível em <http://www.psiqweb.med.br/>, revisto em 2008. Acessado em: 21 de agosto de 2013.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M.B.H.; BERNADINAW; VAN HOOFF, J.A.R.A.M.; DE VRIES, H.W.; MOL, J.A. Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. **Animal Welfare**;9:49–62. 2000.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M.B.H.; JANSSEN, N.S.C.R.M.; MOL, J.A. The use of saliva cortisol, urinary cortisol and catecholamine measurements for a non-invasive assessment of stress responses in dogs. **Hormones and Behavior** 30, 272–279. 1996.
- 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 and Behavior** 66, 243–254. 1999.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M.B.H.; VAN HOOFF, J.A.R.A.M.; DE VRIES, H.W.; MOL, J.A. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. **Applied Animal Behaviour Science** 58, 365–381. 1998.
- BEERDA, B.; SCHILDER, M.B.H.; VAN HOOFF, J.A.R.A.M.; VRIES, H.W. Manifestations of Chronic and Acute Stress in Dogs. **Applied Animal Behaviour Science** 52, 307-3 19. 1997.

- BUSH, B. M; **Interpretação de resultados laboratoriais para clínicos de pequenos animais**. 1 ed. São Paulo: Roca, p. 117-128, 2004.
- CARVALHO, C.C.D.; RÊGO, E.W.; QUEQUE, M.; SOARES, P.C. Avaliação da proteína C reativa, fibrinogênio e leucograma em cadelas com e sem piometra. **Medicina Veterinária**, Recife, v.2, n.2, p.1-8, abr-jun, 2008
- CERÓN, J.J.; ECKERSALL, D.P.; MARTINEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary clinical pathology** 34: 85-99. 2005.
- CORAZZA, M.; MARCOI, B.; ORVELIA, V.; SERGIO, D. Dati preliminari sulla determinazione dell'aptoglobinememia in cani sani ed affetti da patologie in fase acuta e cronica. **Annali della Facolta di Medicina Veterinaria de Pisa**, v.L, p.241-249, 1997.
- CORONHO, V.; PETROIANU, A.; SANTANA, E.M.; PIMENTA, L.G. **Tratado de endocrinologia e cirurgia endócrina**. Guanabara Koogan, 2001
- CREMASCHI, G.A.; GORELIK, G.; KLECHA, A.J.; LYSIONEK, A.E.; GENARO, A.M. Chronic stress influences the immune system through the thyroid axis. **Life Science** 67:3171–3179.2000.
- CUNNINGHAM, J. C. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Ed. Guanabara Koogan. 3ª edição. p. 367. 2004.
- DABROWSKI, R.; WAWRON, W.; KOSTRO, K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with piometra. **Theriogenology**, v.67, p.321–327, 2007.
- DINARELLO, C.A. Interjeukin-1 and the patogenesis of the acute-phase response. **The New England Journal of Medicine**, v.311, n.22, p.1413-1418, 1984.
- GUYTON, A. C.; HALL, J. E. Hormônios Adrenocorticais. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11a Ed. Saunders Elsevier, p. 944 – 959. 2006.
- HAYERBEKE, A.; DIEDERICH, C.; DEPIEREUX, E.; GIFFROY, J.M. Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. **Physiology and Behavior** 93; 59-67. 2008.
- HAYASHI, S.; JINBO, T.; IGUCHI, K.; SHIMIZU, M.; SHIMADA, T.; NOMURA, M.; ISHIDA, Y.; YAMAMOTO, S. A comparison of the concentrations of C-reactive protein and α 1-acid glycoprotein in the serum of Young and adult dogs with acute inflammation. **Veterinary Research Communications**, 25, 117-126. 2001.

- HEKMAN, J.P.; KARAS, A.Z.; DRESCHER, N. A. Salivary cortisol concentrations and behavior in a population of healthy dogs hospitalized for elective procedures. **Applied Animal Behaviour Science** 141: 149– 157. 2012.
- HELMREICH, D.L.; PARFITT, D.B.; LU, X.Y.; AKIL, H.; WATSON, S.J. Relation between the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during repeated stress. **Neuroendocrinology** 81: 183-92. 2005.
- HENNESSY, M.B.; WILLIAMS, M.T.; MILLER, D.D.; DOUGLAS, C.W.; VOITH, V.L. Influence of male and female petters on plasma cortisol and behaviour: can human interaction reduce the stress of dogs in a public animal shelter? **Applied Animal Behavior Science** 61:63–77. 1998.
- HORVATH, Z.; IGYARTO, B.Z.; MAGYAR, A.; MIKLOSI, A. Three different coping styles in police dogs exposed to a short-term challenge. **Hormones and Behavior** 52; 621-630. 2007.
- HORWITZ, D.F. **Terapia comportamentale del cane e del gatto**. UTET, Torino, Italy, pp. 177-178. 2004.
- ITOH, N.; OBATA, K.; YANAIHARA, N.; OKAMOTO, H. Human preprovasoactive intestinal polypeptide contains a novel PHI-27-like peptide, PHM-27. **Nature** 304:547-9. 1983.
- KIKKAWA, A.; UCHIDA, Y.; NAKADE, T.; TAGUCHI, K. Salivary secretory IgA concentrations in beagle dogs. **Journal of Veterinary Medical Science** 65 :689-93. 2003
- KIRSCHBAUM, C.; HELLHAMMER, D.H. Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. **Neuropsychobiology** 22, 150–169. 1989.
- KLENNER, S.; BAUER, N.; MORITZ, A. Evaluation of Three Automated Human Immunoturbidimetric Assays for the Detection of C-Reactive Protein in Dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. DOI: 10.1177/104063871002200408. 2010.
- KOBELT, A.J.; HEMSWORTH, P.H.; BARNETT, J.L.; BUTLER, K.L. Sources of sampling variation in saliva cortisol in dogs. **Research in Veterinary Science** 75:157–61. 2003.

- MARITI, C.; GAZZANO, A.; MOORE, J.L.; BARAGLI, P.; CHELLI, L.; SIGHIERI, C. Perception of dogs' stress by their owners. **Journal of Veterinary Behavior** 7, 213-219. 2012.
- MELAMED-FRANK, M.; LANCHE, O.; ENAV, B.I.; SZAFRANEK, T.; LEVY, N.S.; RICKLIS, R.M.; LEVY, A.P. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. **Blood** v. 98, n. 13, p. 3693-3698, 2001.
- MOBERG, G.P.; MENCH, J.A. **Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare**. Ed. Cabi, 2000, p.3
- MOLD, C.; RODRIGUEZ, W.; RODIC-POLIC, B.; DU CLOS, T. W. C-reactive protein mediates protection from lipopolysaccharide through interactions with FcγR. **The Journal of Immunology**. 169: 7019-7025, 2002.
- MUIR, W.W. Pain and Stress. In. Gaynor Js, Muir WW III, (ed). *Handbook of veterinary pain management*. St Louis; 42- 55, 2008.
- MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, London, v. 168, p. 28–40, 2004.
- OTABE, K.; SUGIMOTO, T.; JINBO, T.; HONDA, M.; KITAO, S.; HAYASHI, S.; SHIMIZU, M.; YAMAMOTO, S. Physiological levels of C-reactive protein in normal canine sera. **Veterinary Research Communications**, 22, 77-85. 1998.
- PAGEAT, P.; LAFONT, C.; FALEWÉE, C.; BONNAFOUS, L.; GAULTIER, E.; SILLIART, B. An evaluation of serum prolactin in anxious dogs and response to treatment with selegiline or fluoxetine. **Applied Animal Behaviour Science** 105: 342-350. 2007.
- PARRA, M.D.; TECLES, F.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; CÉRON, J.J. C-reactive protein measurement in canine saliva. **Journal Veterinary Diagnostic Investigation** 17:139–144 2005
- PASTORE, C.; PIRRONE, F.; BALZAROTTI, F.; FAUSTINI, M.; PIERANTONI, L.; ALBERTINI, M. Evaluation of physiological and behavioral stress-dependent parameters in agility dogs. **Journal of Veterinary Behavior** 6, 188-194. 2011.
- PRUNIER, A.; MOUNIER, A.M.; HAY, M. Effects of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pigs. **Journal Animal Science** 83:216–22. 2005.

- RING, C.; DRAYSON, M.; WALKEY, D.G.; DALE, S.; CARROLL, D. Secretary immunoglobulin A reactions to prolonged mental arithmetic stress: inter-session and intra-session reliability. **Biological Psychology**. 59 (1): 1-13. 2002.
- ROONEY, N.J.; BRADSHAW, J.W.S. Social cognition in the domestic dog: behaviour of spectators towards participants in interspecific games. **Animal Behaviour**. 72, 343–352. 2007.
- SACKMAN, J.E. Pain: its perception and alleviation in dogs and cats. Part I. The physiology of pain. **Comp. Small Anim.**, v.13, p.71-75, 1991.
- SERPELL, J.A.; HSU, Y. Development and validation of a novel method for evaluating behavior and temperament in guide dogs. **Applied Animal Behaviour Science** 72, 347-364. 2001.
- SILBERMAN, D.M.; WALD, M.; GENARO, A.M. Effects of chronic mild stress on lymphocyte proliferative response. Participation of serum thyroid hormones and corticosterone. **International Immunopharmacology** 2:487– 497. 2002.
- SIRACUSA, C. **Perioperative stress in dogs undergoing elective surgery: evaluation of the dog appeasing pheromone (DAP) for the control of behavioural, neuroendocrine, immune and acute phase stress responses**. Tese (Doutorado em Veterinária). Universitat Autònoma de Barcelona, 2009.
- SKANDAKUMAR, S.; STODUSKI, G.; HAU, J. Salivary IgA: a Possible Stress Marker In Dogs. **Animal Welfare**. 4: 339-350. 1995.
- SKUSE, D.; ALBANESE, A.; STANHOPE, R.; GILMOUR, J.; VOSS, L. A new stress-related syndrome of growth failure and hyperphagia in children, associated with reversibility of growth hormone insufficiency. **The Lancet** 348: 353-8. 1996.
- STEPHEN, J. M.; LEDGER, R.A. A longitudinal evaluation of urinary cortisol in kennelled dogs, *Canis familiaris*. **Physiology & Behavior** 87 :911–916. 2006.
- STOCHE, R. M.; GARCIA, L. V.; KLAMT, J. G. Anestesia e resposta neuroendócrina e humoral ao estresse cirúrgico. **Revista Brasileira de Anestesiologia**,v.51, n.1, p. 59 – 69, 2001.
- ULHÔA, M.A.; MORENO, C.R.C. Fatores psicossociais no trabalho e cortisol: breve revisão. **Revista de Gestão Integrada em saúde do Trabalho e Meio Ambiente**. 4(03): 63-73, 2009.
- VIEIRA, J.G.H.; NAKAMURA, O.H.; CARVALHO, V.M. Measurement of free urinary cortisol and cortisone using liquid chromatography associated with tandem

- mass spectrometry method. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia & Metabologia**. 49: 291-298. 2005.
- VINCENT, I.C.; MICHELL, A.R. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. **Research in Veterinary Science** 53, 342–345. 1992.
- WONG, V.M.; KIDNEY, B.A.; SNEAD, E.C.R.; MYERS,S.L.; JACKSON, M.L. Serum C-reactive protein concentrations in healthy Miniature Schnauzer dogs. **Veterinary Clinical Pathology** 40/3, 380–383. 2011.
- YAMAMOTO, S.; MIYAJI, S.; ABE, N.; OTABE, K.; FURUKAWA, E.; NAIKI, M. Canine C-reactive protein (CRP) does not share common antigenicity with human CRP. **Veterinary Research Communications** 17, 259-266. 1993a.
- YAMAMOTO, S.; TAGATA, K.; NAGAHATA, H.; ISHIKAWA, Y.; MORIMATSU, M.; NAIKI, M. Isolation of canine Creactive protein and characterization of its properties. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.30, p.329–339, 1992.
- YEAGER, M. P.; GUYRE, P. M.; MUNCK, A. U. Glucocorticoid regulation of the inflammatory response to injury. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v.48, n.7, p.799 – 813, 2004.

CAPÍTULO 3

Avaliação do estresse de cães submetidos à esterilização química por meio de injeção intratesticular de solução à base de zinco em comparação com a orquiectomia.

Resumo: O crescimento descontrolado da população canina nos centros urbanos ocasionam sérios problemas de saúde pública. Métodos alternativos de contracepção têm sido bastante discutidos, mas ainda existe polêmica no que diz respeito ao efeito álgico dos agentes esclerosantes. Este trabalho teve como objetivo avaliar o grau de desconforto causado pela castração química por meio da injeção intratesticular de gluconato de zinco e comparar com o procedimento convencional da orquiectomia, levando-se em consideração parâmetros comportamentais e bioquímicos. Dezenove cães machos foram distribuídos aleatoriamente em três grupos: G1 (controle – submetidos apenas à procedimento anestésico), G2 (orquiectomia) e G3 (injeção intratesticular de gluconato de zinco). As avaliações foram realizadas em cinco diferentes momentos (M0, M1, M2, M3 e M4), e foram avaliados cortisol plasmático, glicose sérica, leucograma de estresse (neutrófilos/linfócitos) e grau de desconforto por meio da Escala de Melbourne. Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de cortisol e contagem de leucócitos. O grau de desconforto foi maior no G2, apesar de não ultrapassar o escore de dor leve segundo a Escala de Melbourne. A concentração sérica de glicose foi estatisticamente maior no G3 quando comparada com o G2, embora ambos tenham sido semelhantes ao grupo controle. Diante dos resultados concluiu-se que a esterilização química causa um desconforto similar àquele gerado pelo procedimento de orquiectomia, podendo ser utilizado como procedimento de rotina no controle da fertilidade de cães.

Palavras-chave: *Canis lupus familiaris*, contracepção, agentes esclerosantes

Evaluation of stress in dogs subjected to chemical sterilization by means of intratesticular injection of zinc based compared to orchietomy.

Abstract: The uncontrolled growth of the dog population in urban centers cause serious public health problems. Alternative methods of contraception have been widely discussed, but there is still controversy regarding the painful effects of sclerosing agents. This study aimed to characterize the degree of discomfort caused by chemical castration by zinc gluconate intratesticular injection and compare it with the conventional procedure of orchietomy, taking into consideration both behavioral and biochemical parameters. Nineteen male dogs were randomly divided into three groups: G1 (control – subjected to anesthesia only), G2 (orchietomy) and G3 (zinc gluconate intratesticular injection). The evaluations were performed at five different moments (M0, M1, M2, M3 and M4), in which were evaluated plasma cortisol, serum glucose, stress leukogram (neutrophils / lymphocyte) and pain level according to the Melbourne Scale. No significant differences in the concentrations of cortisol and leukocyte count were found. The degree of discomfort was higher in G2, despite not exceeding the mild pain score according to the Melbourne Scale. Serum glucose concentration was statistically higher in G3 compared with G2, even though both were similar to the control group. In face of the results it was concluded that chemical sterilization causes

similar discomfort to that generated by orchietomy procedure and can be used as a routine procedure in the control of fertility in dogs.

Keywords: *Canis lupus familiaris*, contraception, sclerosing agents

1. INTRODUÇÃO

Estima-se que a população canina esteja em torno de 10% da humana na área urbana devido à reprodução descontrolada de cães e gatos errantes, ocasionando sérios problemas à saúde animal e pública (Mascarenhas, 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde (1990), as atividades isoladas de recolhimento e eliminação de cães e gatos não são efetivas para o controle da dinâmica dessas populações, sendo necessário, portanto, atuar na causa do problema: a procriação animal sem controle, e a falta de responsabilidade do ser humano quanto à sua posse, propriedade ou guarda.

Métodos alternativos de contracepção em cães e gatos têm sido bastante discutidos. Na espécie canina, a contracepção em machos, pode ser realizada por métodos cirúrgicos, imunológicos, hormonais ou químicos. A castração química tem sido sugerida como alternativa rápida e de baixo custo, que poderia ser utilizada em larga escala na população canina e felina, especialmente nas regiões de populações carentes onde o problema é mais intenso (Immegart e Threlfall, 2000; Cedilho et al, 2006). Entre os diversos agentes esclerosantes utilizados em machos caninos e felinos, estão o dimetil-sulfóxido (Pineda et al., 1977; Pineda e Doley, 1984), ácido láctico (Nishimura et al., 1992), gluconato de zinco (Fahim et al, 1993; Oliveira et al., 2007), glicerol (Immegart e Threlfall, 2000), clorexidina (Aiudi et al., 2010) e cloreto de cálcio (Baran et al., 2010). Alguns desses agentes causam dor e febre, inflamação ou até mesmo orquite grave após injeção intratesticular (Jana et al., 2005).

Apesar da variedade de agentes químicos utilizados com a finalidade de contracepção, há relatos de dor e pirexia em ratos (Jana e Samantha, 2006), cães (Soto et al., 2007) e gatos (Jana e Samanta, 2011). A contracepção química com produtos contendo gluconato de zinco é considerada um procedimento seguro e eficaz (Wang, 2004; Bowen, 2008; Soto et al., 2009; Oliveira et al., 2011), e apesar de alguns estudos sugerirem que o produto não produz efeito álgico perceptível (Tepsumethanon et al., 2005; Soto *et al* 2009; Oliveira et al., 2011), não existem avaliações direcionadas especificamente para este quesito. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o

grau de desconforto causado pela castração química por meio da injeção intratesticular de gluconato de zinco e comparar com o procedimento convencional da orquiectomia, levando-se em consideração parâmetros comportamentais e bioquímicos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, sob protocolo de número 23082.022151/2012, licença nº 068/2013. O experimento foi conduzido na cidade do Recife, Brasil, entre os meses de abril a dezembro de 2013. Foram utilizados 19 cães machos (15 sem raça definida, 2 pinschers, 1 husck siberiano e 1 pitbull), com idades entre 1 e 8 anos e peso médio de 13,9kg. Os animais foram provenientes de ONGs e propriedades particulares, sendo mantidos durante todo o experimento em seus lugares de origem, com fornecimento de água a vontade e alimento segundo o de costume.

Todos os animais foram submetidos a exame clínico e à coleta de sangue para hemograma completo e dosagem sérica de cortisol e glicose, antes do experimento. Foram excluídos do projeto os animais que faziam uso de corticoides ou outros fármacos que pudessem comprometer o andamento do mesmo, assim como aqueles portadores de doenças crônicas ou outros distúrbios detectados no exame clínico.

Os cães foram distribuídos, aleatoriamente, em três grupos: grupo controle (G1)(n=5), grupo de castração cirúrgica (G2)(n=7) e grupo de castração química (G3)(n=7).

2.2. Procedimento anestésico

Em todos os grupos, os animais foram submetidos a jejum sólido de 12 horas e hídrico de 4 horas, antes do procedimento. Foram levados ao Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HOVET-UFRPE), e submetidos à medicação pré-anestésica (MPA) com acepromazina (0,05mg/kg, IM). Decorridos 15 minutos, o acesso venoso foi realizado pela fixação de cateter na veia cefálica, e iniciada administração de infusão contínua de NaCl 0,9 % . A indução anestésica foi realizada mediante administração de propofol (4mg/kg, IV), os cães foram intubados

oro-traquealmente, colocados em decúbito dorsal, e mantidos em plano anestésico com isoflurano, por um período aproximado de 15 minutos.

2.3. Orquiectomia

Para a orquiectomia os animais foram preparados de forma asséptica e utilizou-se a técnica pré-escrotal, segundo Tudury & Potier (2009).

2.4. Esterilização química por meio de injeção intratesticular de gluconato de zinco

Para a esterilização química foi mensurado o diâmetro testicular com a utilização de um paquímetro, e o escroto foi limpo com solução anti-séptica. As doses da solução a base de zinco foram administradas de acordo com o diâmetro testicular, segundo Wang (2002) (Figura 1). Foram utilizadas seringa e agulha de insulina (13 x 4,5mm), uma para cada testículo, para injetar o volume da solução à base de zinco. Uma única injeção foi realizada lentamente na região dorso-cranial de cada testículo, ao lado da cabeça do epidídimo (o mais próximo possível do ducto eferente e rede testicular) e a agulha foi inserida num plano paralelo em relação ao testículo.

A solução utilizada contém 0,2M de zinco, cujo pH foi neutralizado em veículo fisiológico não irritante desenvolvido pela Biorelease Technologies LLC (Birmingham, Alabama, USA), sendo a concentração final de 13,1mg de zinco por ml de solução.

Tabela 1 - Volume da solução à base de zinco injetada no testículo dos cães segundo o diâmetro testicular dos mesmos

Diâmetro do testículo (mm)	Dose por testículo (ml)	(mg de zinco)
10 - 12	0,2	2,6
13 - 15	0,3	3,9
16 - 18	0,5	6,6
19 - 21	0,7	9,2
22 - 24	0,8	10,5
25 - 27	1,0	13,1

(Wang, 2002)

2.5. Grupo controle

No grupo controle os animais foram submetidos apenas ao procedimento anestésico, posicionados em decúbito dorsal, e assim permaneceram, por aproximadamente 15 minutos, sem que nenhum outro procedimento fosse realizado.

Após o retorno anestésico, nos três grupos, foi administrado dipirona (25mg/kg) por via oral, em dose única, e os animais foram levados ao seu ambiente de origem.

2.6. Momentos de avaliação

As avaliações e coletas de amostras foram realizadas nos seguintes momentos:

M0 – no recinto onde vivem os animais, um dia antes do procedimento (valores basais);

M1 – no Hospital Veterinário, imediatamente antes da medicação pré-anestésica;

M2 – no Hospital Veterinário, após o retorno anestésico (aproximadamente 2 horas);

M3 – no recinto onde vive o animal, 24 horas após o procedimento;

M4 – no recinto onde vive o animal, 10 dias após o procedimento.

2.7. Avaliação do comportamento

2.7.1. Escala de Melbourn

A caracterização do grau de dor e do grau de conforto/desconforto apresentado pelos animais foi aferida por meio da avaliação comportamental, em todos os momentos de avaliação do experimento (M0, M1, M2, M3 e M4), através da utilização da Escala de Dor da Universidade de Melbourn (Anexo I).

2.7.2. Questionário ao Proprietário

Para avaliar o julgamento do proprietário em relação ao desconforto causado pelo procedimento, foi utilizado um questionário adaptado (Imagawa, 2006) (Anexo II), que

foi entregue no dia do procedimento e recolhido no ultimo dia de avaliação (M4). Dos questionamentos, levou-se em consideração a opinião do proprietário com relação à classificação da dor em: Ausência de dor, Dor leve, Dor moderada ou Dor intensa. Nos animais que apresentaram dor, considerou-se ainda por quantos dias esse parâmetro foi observado.

2.8. Amostras

Amostras de sangue foram coletadas em todos os momentos do experimento (M0, M1, M2, M3 e M4), com os animais em jejum alimentar de 12 horas. Foram coletados 5ml de sangue da veia cefálica ou jugular e divididas em duas alíquotas, sendo uma colocada em tubo sem anticoagulante, para análise de cortisol e a outra colocada em tubos contendo solução de anticoagulante ácido etilenodiaminotetra-acético tripotássico (EDTA-K3) a 10%, para análise de glicose e hemograma, e foram encaminhadas imediatamente ao laboratório de patologia clínica veterinária Zoo Análises.

As amostras para cortisol foram centrifugadas, separado o soro, congelado à -18°C até a análise que foi realizada em equipamento de leitura de ELISA da marca bioclin, e foram utilizados kits comerciais (Diagnostics Biochem, Canadá) seguindo as orientações do fabricante.

As amostras para glicose foram centrifugadas e o plasma foi congelado à -18°C até a análise que foi realizada em analisador semiautomático (Doles D-250, Doles, Brasil), foram utilizados kits comerciais (Doles, Brasil) seguindo as orientações do fabricante.

O hemograma foi realizado com auxílio de uma Câmara de Neubauer para contagem de hemácias e leucócitos, e as contagens de plaquetas através do método indireto no esfregaço sanguíneo. A contagem diferencial leucocitária bem como as observações das alterações morfológicas foram realizadas em esfregaço sanguíneo corado pelo corante panótico (Instant Provò) (Newprov, Paraná, Brasil).

2.9. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise da variância (ANOVA), para medidas repetidas e com 1 ou 2 fatores, com o P estabelecido em 5%. Em seguida as diferenças entre as médias foram identificadas através do teste de Tukey, em nível de 5%. Também foi utilizado o método de Pearson para as correlações. Os resultados estão expressos em

média +/- erro padrão médio. Para todas as análises utilizou-se o programa SigmaStat 3.0.

3. RESULTADOS

Dos 14 animais submetidos à esterilização, dois precisaram de analgesia de resgate, que foi feito com administração de dipirona (25 mg/kg, VO), sendo um cão do grupo cirúrgico no dia do procedimento e no dia seguinte, e um do grupo químico, apenas no dia do procedimento. Das complicações observadas neste trabalho, podem ser citadas edema escrotal nos animais dos dois grupos, e inflamação/infecção de ferida cirúrgica em um cão submetido à orquiectomia, sendo necessário administração de anti-inflamatório e antibiótico.

Visto que a resposta ao estresse e a dor é altamente variável e depende da experiência individual de cada animal, buscou-se neste trabalho a união de vários biomarcadores, a fim de tornar mais confiável a avaliação do desconforto na esterilização química e cirúrgica (Tabela 1).

De forma geral foi possível observar que não houve diferença estatística para o cortisol para os diferentes grupos, mas houve diferença extremamente significativa entre os momentos ($P < 0,001$) e houve interação grupo x momento ($P < 0,01$). Já em relação à glicose, houve diferença estatística apenas entre os grupos ($P < 0,01$). Quando se considera o escore de dor, observa-se diferença estatística extremamente significativa entre os momentos ($P < 0,001$). Para a contagem total de glóbulos brancos e de linfócitos não houve diferença significativa, e para neutrófilos, observou-se diferença estatística significativa entre os momentos avaliados ($P < 0,05$). A discussão foi direcionada aos parâmetros que apresentaram alterações estatísticas significativas.

Tabela 2 – Análise de variância, com dois fatores e medidas repetidas, para os diferentes biomarcadores sanguíneos e comportamentais em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química

Parâmetro Analisado	Resultados		
	Tratamento	Momento	Tratamento x Momento
Cortisol	NS	$P < 0,001$	$P < 0,01$
Glicose	$P < 0,01$	NS	NS

Escore de Dor	NS	P < 0,001	NS
CGB	NS	NS	NS
Neutrófilos	NS	P < 0,05	NS
Linfócitos	NS	NS	NS

*NS = Não significativo

3.1. Avaliação do comportamento

3.1.1. Escala de Melbourn

O escore de dor encontrado ao se utilizar a Escala de Melbourn, apresentou diferença estatística entre o G2 e G3 ($6,83 \pm 0,60$ e $4,57 \pm 0,57$, respectivamente; $P < 0,05$) apenas na avaliação realizada logo após o procedimento (M2)(Tabela 4, anexo IV). Ainda, ao se comparar o grupo controle (G1) cujo escore foi de $4,25 \pm 0,48$ com os outros dois grupos, observou-se que o G2 apresentou um escore estatisticamente superior ($6,83 \pm 0,60$), enquanto o G3 foi semelhante ao controle ($4,57 \pm 0,57$).

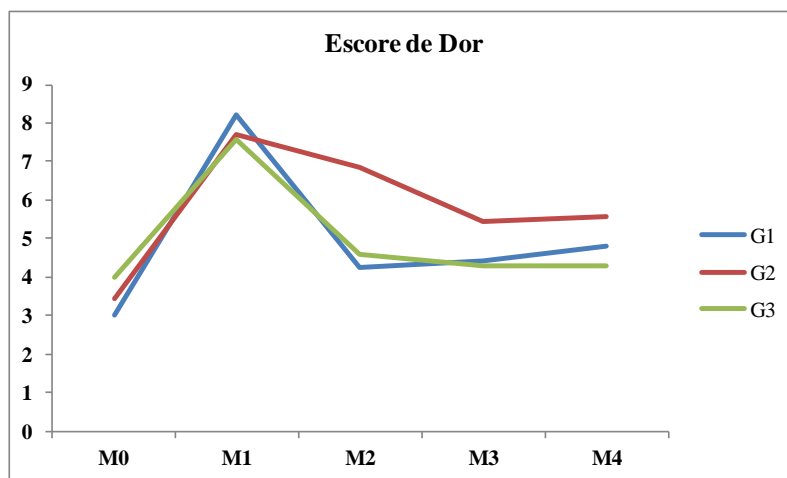


Gráfico 1.- Variação da pontuação obtida através da utilização da Escala de Dor da universidade de Melbourn em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química, nos diferentes momentos avaliados

3.1.2. Questionário ao Proprietário

Segundo a classificação dos proprietários, dos animais castrados cirurgicamente (G2), 85,71% (6/7) apresentaram dor leve, e 14,28% (1/7), ausência de dor. Dos que sentiram algum tipo de dor, 14,28% (1/7) apresentaram no dia do procedimento,

28,57% (2/7) apenas no dia seguinte e 42,85% (3/7) sentiram dor por até três dias. Dos animais castrados quimicamente (G3), 57,14% (4/7) sentiram dor leve, 14,28% (1/7) dor moderada e 28,57% (2/7) dor intensa, sendo 85,71% (6/7) no dia do procedimento e 14,28% (1/7) por até três dias.

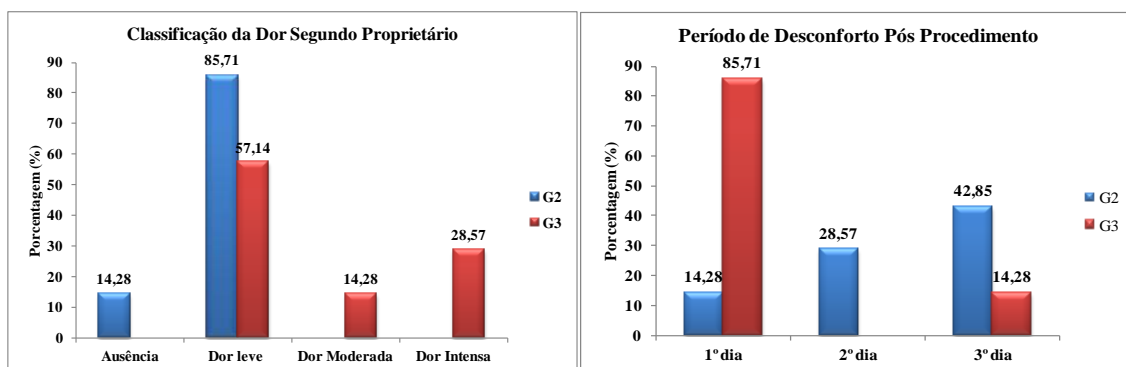


Gráfico 2.- Classificação subjetiva da dor segundo observação do proprietário (1) e período (em dias) de desconforto observado pelos proprietários (2).

3.2. Avaliação do cortisol

O pico de cortisol foi observado no momento seguinte ao procedimento (M2) no G2 e G3 ($19,00 \pm 2,62 \mu\text{g/dl}$ e $17,32 \pm 3,62 \mu\text{g/dl}$, respectivamente), cujos valores foram estatisticamente superiores ao grupo controle (G1) ($5,02 \pm 1,30 \mu\text{g/dl}$) (Tabela 5, Anexo IV).

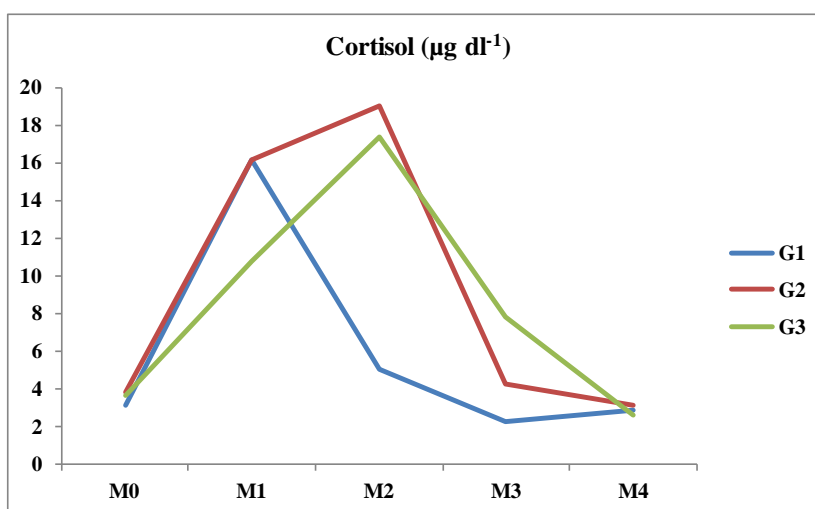


Gráfico 3.- Variação na concentração plasmática de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química, nos diferentes momentos de avaliação

3.3. Avaliação da glicose sérica

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os momentos de avaliação nos três grupos, assim, foram consideradas as médias gerais entre os grupos para efeito de análise.

As concentrações médias de glicose (mg/dl) foram de $129,37 \pm 4,26$, $125,85 \pm 3,56$ e $140,64 \pm 3,63$ para os grupos G1, G2 e G3, respectivamente (Tabela 3). A concentração sérica de glicose foi estatisticamente maior no G3 quando comparado com o G2, embora ambos tenham sido semelhantes ao grupo controle (G1).

Tabela 3 – Concentração sérica de glicose* (mg/dL) de cães submetidos à orquiectomia e esterilização química por meio de injeção intratesticular de gluconato de zinco

Parâmetro	Grupos		
	Controle (G1)	Cirúrgico (G2)	Químico (G3)
Glicose	$129,37 \pm 4,26^{AB}$	$125,85 \pm 3,56^B$	$140,64 \pm 3,63^A$

OBS. Letras diferentes na mesma linha indicam que $P < 0,05$ pelo teste de Tukey

*Foram consideradas as médias e desvios-padrão gerais para efeito de análise, uma vez que não houve diferença significativa entre os momentos de avaliação, quais sejam; M0, M1, M2, M3 e M4

3.4. Avaliação dos Neutrófilos

A contagem de neutrófilos teve aumento nos grupos 2 e 3, no dia seguinte ao procedimento (M3) (Tabela 6, Anexo IV). Não houve diferença estatística entre o G2 ($9,24 \pm 1,05 \times 10^3/\mu\text{L}$) e o G3 ($10,26 \pm 1,16 \times 10^3/\mu\text{L}$), entretanto ambos foram estatisticamente diferentes ao G1 ($5,68 \pm 1,04 \times 10^3/\mu\text{L}$).

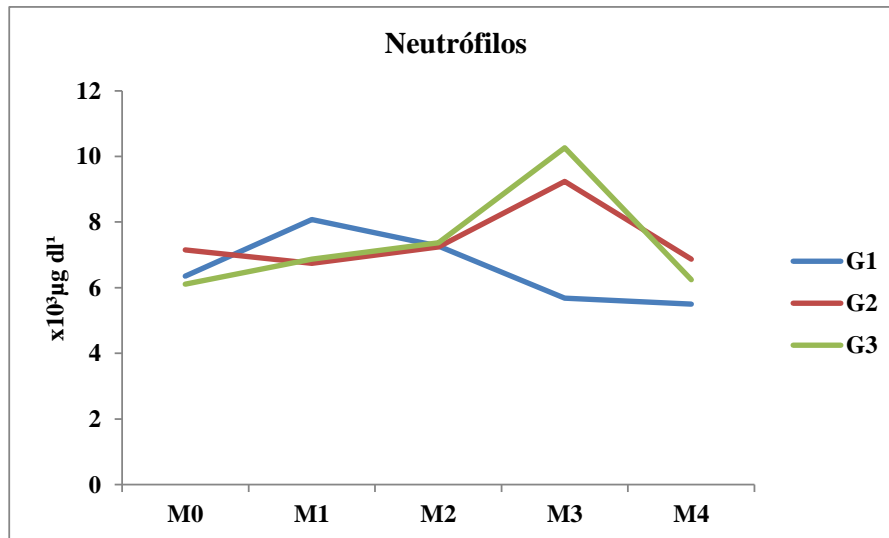


Gráfico 4.- Variação na contagem sanguínea de neutrófilos ($\times 10^3 \mu\text{g/dL}$) em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química, nos diferentes momentos de avaliação

4. DISCUSSÃO

Segundo a literatura consultada, este é o primeiro trabalho que compara a castração cirúrgica e a química de cães por meio da injeção intratesticular de gluconato de zinco em termos de desconforto, levando-se em consideração o comportamento e marcadores bioquímicos.

Neste trabalho a avaliação do comportamento foi realizada em todos os momentos do experimento (M0, M1, M2, M3 e M4), sempre pelo mesmo avaliador, diminuindo assim, o fator variabilidade entre observadores. A escala utilizada (EDUM) foi baseada em respostas comportamentais e fisiológicas específicas, e incluiu múltiplas descrições organizadas em seis categorias de parâmetros ou comportamentos relacionados com a dor.

A interpretação da Escala de Melbourne varia entre os autores. Segundo Firt e Haldane (1999), o animal apresenta dor quando o escore fica acima de 13 na escala, Almeida et al. (2010), por sua vez, consideraram a presença de dor quando os animais apresentaram escore acima de 10 na escala. No presente trabalho, os animais não ultrapassaram o escore 10 na escala de Melbourne, o que sugere que tanto a castração cirúrgica quanto a química causam apenas desconforto ou dor leve, não sendo suficiente para gerar alterações significativas na Escala de Melbourn. A média encontrada de cada grupo foi semelhante à encontrada por Coutinho (2012) após

ovariosalpingohisterectomia eletiva em cadelas, por dois diferentes avaliadores utilizando a escala de Melbourn.

Apesar de escores menores que dez, os animais submetidos à orquiectomia (G2), apresentaram valores estatisticamente superiores aos grupos 1 e 3, sugerindo que o nível de desconforto gerado pela esterilização cirúrgica pode ser maior que o da esterilização química, diferente do trabalho apresentado por Paula e Molento (2012) que, utilizando a mesma escala para comparar três métodos de esterilização em cães machos (orquiectomia, vasectomia e injeção intratesticular de gluconato de zinco), não encontraram diferença estatística entre os grupos. Por outro lado, segundo Kukanich (2011), em alguns casos, as alterações também podem ser resultado de estresse, ansiedade ou de um animal que esteja se recuperando da anestesia, e não exatamente por que sofre de um processo álgico. Vale ressaltar ainda que foi observado, no presente trabalho, uma correlação positiva entre escore de dor e concentração de cortisol plasmático ($r = 0,41$; $P < 0,01$), sugerindo uma boa sensibilidade da escala de Melbourn para identificação do desconforto

A classificação da dor por meio da aplicação de questionário aos proprietários se assemelha à utilização da escala descritiva simples, a qual é classificada em quatro níveis (indolor, ligeira, moderada, intensa). Os proprietários cujos animais foram submetidos à castração química classificaram o desconforto/dor apresentado por seus animais em leve (57,14%), moderada (14,28%) e intensa (28,54%). Os proprietários cujos animais foram submetidos à castração cirúrgica classificaram o desconforto/dor apresentado por seus animais em leve (100%). Segundo Robertson (2006), apesar de ser um método simples, esta avaliação é muito pouco sensível uma vez que pode ser influenciada pelo observador. Por outro lado, Serpell e Hsu (2001) sugerem que metodologias que aplicam questionários com os tutores dos animais têm uma potencial aplicabilidade para medir o comportamento baseando-se no fato de que os donos conhecem o comportamento dos seus cães melhor do que ninguém. Ainda, num estudo realizado por Mariti et al (2012), sobre a percepção do estresse em cães por seus proprietários, observou-se que mais da metade dos entrevistados foram capazes de identificar corretamente o estresse como alteração a curto ou longo prazo do equilíbrio psicofísico que pode evoluir para doença; os autores destacaram que essa capacidade foi maior nas pessoas com níveis educacionais mais elevados.

Com relação ao tempo de desconforto experimentado pelos animais, segundo seus proprietários, mais de 80% (6/7) dos animais castrados quimicamente apresentaram desconforto apenas no dia do procedimento, enquanto que os castrados cirurgicamente pareceram experimentar esse desconforto por um período maior de tempo (28,57% até o dia seguinte e 42,85% por até três dias). Isso talvez se deva ao fato de que terminações nervosas associadas à sensação de dor estão localizadas sobre a pele do escroto e na cápsula do testículo, em vez de no parênquima do testículo e epidídimo (Tawar e Naz, 1981). Na castração cirúrgica é realizado incisão, envolvendo tecido inervado, o que, segundo Almeida et al. (2010), pode contribuir para morbidade pós-operatória; já na castração química o desconforto apresentado pelos animais pode ser devido ao aumento transitório do diâmetro testicular observado após o procedimento que leva à compressão das terminações nervosas localizadas no escroto.

Muito se têm falado em avaliação do estresse em sinônimo à avaliação da dor. De fato, a dor é um estímulo estressante, e pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional aversiva, que alerta o indivíduo sobre uma lesão ou ameaça à integridade de seus tecidos (Molony e Kent, 1997). O cortisol é um biomarcador comumente utilizado para avaliação de estresse em cães (Haverbeke et al, 2008), e tem sido muito utilizada para medir estresse e dor induzida após cirurgias em cães.

No presente trabalho, o aumento da concentração de cortisol acima dos valores fisiológicos para a espécie canina foi observado nos três grupos já na chegada dos animais ao hospital veterinário (M1), o que demonstra que o simples deslocamento dos animais para um ambiente estranho pode vir a gerar estresse. Este se manteve elevado no momento seguinte à cirurgia (19,0) e castração química (17,32) (M2), não sendo observada diferença estatística entre os valores, mas diminuiu para valores considerados fisiológicos para a espécie (Kaneko et al., 2008) no grupo controle. Quessada et al. (2009) comparando diferentes técnicas de ovariossalpingohisterectomia em cadelas, encontrou valores de cortisol plasmático pós-operatório próximos a 11µg/dl.

Os resultados do presente trabalho confirmam que tanto a castração química quanto a orquiectomia são procedimentos estressantes para o animal e, ainda, que o estresse causado pela primeira é semelhante ao observado na segunda, procedimento convencional utilizado para a esterilização de machos.

E importante salientar que as amostras de sangue dos animais foram coletadas respeitando-se o horário (sempre pela manhã), a fim de diminuir a oscilação circadiana

do cortisol. O tempo de contenção necessário para a coleta também foi levado em consideração para que o mesmo não interferisse com os resultados.

Durante a situação de estresse, o aumento do cortisol e de catecolaminas resulta no aumento da glicose plasmática (Thrall et al., 2007). No presente trabalho as concentrações de glicose encontravam-se todas acima dos valores considerados fisiológicos para a espécie canina (118 mg/dl, Kaneko et al., 2008) em todos os momentos de avaliação. Os animais submetidos à castração química apresentaram concentrações de glicose estatisticamente superiores aos animais submetidos à orquiectomia, entretanto, ambos os valores foram semelhantes ao grupo controle. Neste caso a hiperglicemia, pode ter sido consequência do estresse gerado pela manipulação e previsão do animal à coleta de sangue que, segundo Thrall et al. (2007), são procedimentos que contribuem para o aumento da liberação das catecolaminas, podendo elevar a concentração de glicose acima do limiar renal, chegando à glicosúria em cães.

Comparando-se o comportamento do cortisol e da glicose no presente trabalho, não foi possível observar similaridade entre as oscilações dos dois parâmetros nos diferentes momentos. Assim como o observado por Freeman et al. (2010), que ao compararem diferentes técnicas de ovariectomia em cadelas, relataram aumento sérico no valores de cortisol sem haver diferenças significativas na concentração de glicose. No entanto, Caldeira et al. (2006), avaliando cortisol e glicemia em cadelas tratadas com tramadol e submetidas à ovário-histerectomia, relataram que os dois parâmetros utilizados foram sensíveis para detecção do período de maior estresse cirúrgico, havendo similaridade no comportamento dos dois biomarcadores.

No presente trabalho foi observado aumento na contagem de neutrófilos para os grupos 2 e 3 no M3 (24h após a cirurgia ou castração química), apesar de estarem dentro da referência considerada normal para a espécie. Esse aumento já era esperado visto que os animais haviam sido submetidos a orquiectomia e injeção intratesticular, respectivamente, levando a um processo inflamatório. Segundo Thrall et al (2007), a resposta leucocitária associada a doença inflamatória, dor e estresse pode ser detectada através da alteração em vários tipos celulares, sendo a segunda alteração mais consistente a duplicação da população de neutrófilos circulantes. Não houve diferença significativa entre os grupos 2 e 3, o que mostra que a castração química e a orquiectomia se comportam de maneira semelhante diante de um processo inflamatório. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Imagawa (2006), onde as

contagens de leucócitos apresentaram aumento significativo no período pós-operatório em cadelas submetidas a ovariosalpingohisterectomia. Já os animais do grupo controle, que não foram submetidos a nenhum procedimento traumático, não apresentaram aumento da resposta leucocitária.

5. CONCLUSÕES

A esterilização por meio de injeção intratesticular de gluconato de zinco é um procedimento que causa desconforto ou dor leve, semelhante ao observado no procedimento convencional da orquiectomia. Assim, esta técnica pode ser utilizada na rotina da clínica de pequenos animais, bem como em programas de controle populacional.

6. REFERÊNCIAS

- AIUDI G, SILVESTRE F, LEOCI R, LACALANDRA GM. **Single testicular injection Chlorhexidine solution as a chemical sterilant in dogs.** In: International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control, 4, 2010, Dallas, TX. *Proceedings ...* Dallas, TX: ACC & D, 2010.
- ALMEIDA, R.M; ESCOBAR, A; MAGUILNIK, S. **Comparison of analgesia provided by lidocaine, lidocaine-morphine or lidocaine-tramadol delivered epidurally in dogs following orchietomy.** *Veterinary Anaesthesia and Analgesia.* V.37, p. 542-549, 2010.
- animals.** 6 th Ed. 2008
- BARAN A, OZDAS OB, GULCUBUK A, HAMZAOGLU AI, TONGUC M. **Pilot study: intratesticular injection induces sterility in male cats.** In: International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control. 4, 2010, Dallas, TX. *Proceedings ...* Dallas, Texas: ACC & D, 2010.
- BOWEN, RA - **Male contraceptive technology for nonhuman male mammals -** *Animal Reproduction Science* 105 (2008) 139–143.

- CALDEIRA, F.M.C.; OLIVEIRA, H.P.; MELO, E.G.; MARTINS, C.; VIEIRA, M.S.; SILVA, C.N. **Cortisol sérico e glicemia em cadelas tratadas com tramadol e submetidas à ovariectomia-histerectomia.** *Ciência Rural*, vol. 36, núm. 1, janeiro-fevereiro, 2006, pp. 155-160
- CEDILLO, VG; VARGAS, PF; MONROY, OV - **Results of the massive sterilization project using gluconate neutralized with arginine in male dogs living in the States of Hidalgo, Mexico and Puebla.** *In: Proceedings of the XVII Rabies in the Americas (RITA)*, 2006.
- COUTINHO, AFOSV. **Subjetividade na Avaliação da Dor Animal.** Dissertação. Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. 2012.
- FAHIM MS, WANG M, SUTCU MF, FAHIM Z, YOUNGQUIST RS. **Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine.** *Contraception*, v.47, p.107-22, 1993.
- FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. **The adrenal gland.** *In: _____*. Canine and feline endocrinology and reproduction. Philadelphia: Saunders, 1985. p.187-322.
- FIRTH, A. M.; HALDANE, S. L. **Development of a scale to evaluate postoperative pain in dogs.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 214, n. 5, p. 651-659, 1999.
- FREEMAN, L.J.; RAHMANI, E.Y.; AL-HADDAD, M.; SHERMAN, S. CHIOREAN, M. V.; SELZER, D.J.; SNYDER, P.W.; CONSTABLE, P.D. Comparison of pain and postoperative stress in dogs undergoing natural orifice transluminal endoscopic surgery, laparoscopic, and open oophorectomy. *Gastrointestinal Endoscopy*. Vol 72, No. 2 : 2010
- HAYERBEKE, A., DIEDERICH, C., DEPIEREUX, E., GIFFROY, J.M., 2008. **Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges.** *Physiology Behavior*. 93, 59–67.
- IMAGAWA, V.H. **Avaliação da Eficácia analgésica de três doses diferentes da dipirona sódica em cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia.**(Tese) Faculdade de medicina da universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.
- IMMIGART HI, THRELFALL WR. **Evaluation of intratesticular injection of glycerol for nonsurgical sterilization of dogs.** *Am J Vet Res* , v.61, p.544 - 549, 2000

- JANA K, SAMANTA PK, GHOSH D. **Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization of male Black Bengal goats (*Capra hircus*): a dose-dependent study.** *Animal Reproduction Science* 86: 89-108, 2005.
- JANA K, SAMANTA PK. **Clinical evaluation of non surgical sterilization of male cats with single intratesticular injection of calcium chloride.** *BMC Veterinary Research* 2011. Available on: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/7/39>. Accessed: on October 21 2011.
- JANA K, SAMANTA PK. **Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for non-surgical sterilization in adult albino rats.** *Contraception* 2006, 73:289-300.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical biochemistry of domestic**
- KUKANICH, B. **Analgesia and pain assessment in veterinary research and clinical trials:** Guest Editorial. *The Veterinary Journal*. London, v. 188, n. 1, p. 1-2, 2011.
- MACHADO, MA; NAVARRO, IT; FRÜHVALD, E; ZANONI, FP; TOKIOSHI, AF ; LACERDA, LCC - **Posse responsável e controle populacional de cães e gatos e sua contribuição para a redução da eutanásia na população errante de Londrina e região.** In: *Anais do 35º Conbravet*, Gramado, RS. p.706-9, 2008.
- management*. St Louis: Mosby: 78-107.
- MARITI, C.; GAZZANO, A.; MOORE, J.L.; BARAGLI, P.; CHELLI, L.; SIGHIERI, C. Perception of dogs' stress by their owners. *Journal of Veterinary Behavior* 7, 213-219. 2012.
- MASCARENHAS, NMF; HILST, CLS; SOUZA, MSB; MARTINS, MIM; PIROLO, J; NABUT, LB ; MICH PM, HELLYER PW (2008). **Objective, Categorical Methods for Assessing Pain and Analgesia** . In W. W. Muir III & J. S. Gaynor *Handbook of Pain management* (p7-177) 85
- MICH, & HELLYER. (2009). **Objective, Categorical Methods for Assessing Pain and Analgesia.** In W. W. Muir III & J. S. Gaynor (Eds.), *Handbook of Pain management* (pp. 78-109). St. Louis: Mosby.
- MOLONY, V., KENT, J. E. **Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements.** *Journal Animal Science*. v.75, p.266–272, 1997.

- MUIR WW III, GAYNOR JS (2008). **Pain Behaviors**. In: Gaynor Js, Muir WW III, (ed). *Handbook of veterinary pain management*. St Louis: Mosby: 62-77.
- NELSON, R. W. **Canine diabetes mellitus**. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. Textbook of veterinary internal medicine. 7 th ed. St. Louis Missouri, Saunders Elsevier, 2010, p. 1782 – 1796.
- NISHIMURA N, KAWATE N, SAWADA T, MORI J. **Chemical castration by single intratesticular injection of lactic acid in rats and dogs**. *J Reprod Dev*, v.38, p.263-266, 1992.
- OLIVEIRA ECS, MOURA MR, SÁ MJC, SILVA JR VA, KASTELIC JP, DOUGLAS RH, MARQUES JR AP. **Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a zinc gluconate-based solution**. *Theriogenology*. 2011
- OLIVEIRA ECS, MOURA MR, SILVA JR. VA, PEIXOTO CA, SARAIVA KL, SÁ MJ, DOUGLAS RH, DE PINHO MARQUES JR AP. **Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs**. *Theriogenology*, v.68, p.137-145, 2007.
- PAULA, PMC; MOLENTO, CFM. **Avaliação da Dor Pós-intervenção em Três Métodos de Esterilização de Cães Machos**. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 49, n. 4, p. 255-261, 2012
- PINEDA MH, DOOLEY MS. **Surgical and chemical vasectomy in the cat**. *Am J Vet Res*, v.45, p.291-300, 1984.
- PINEDA, AMH, REIMERS TJ, FAULKNER LC, HOPWOOD ML, SEIDEL GE JR. **Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides**. *Am J Vet Res*, v.38, p.831-838, 1977.
- QUESSADA, A.M; SOUSA, A.A.R.; COSTA, A.P.R.; SOUSA, A.A.S.; ROCHA, R.R.C. **Comparação de técnicas de ovariosalpingohisterectomia em cadelas**. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37 (3): 253-258. 2009
- ROBERTSON S.(2006). **A Review of opioid use in cats** In *Gleed RD, Ludders JW, eds.Recent Advances in Veterinary Anesthesia and Analgesia: Companion Animals*. Ithaca, New York USA: International Information Service Acedido em dec. 26, 2008, disponível em: www.IVIS.org.

- SERPELL, J.A.; HSU, Y. Development and validation of a novel method for evaluating behavior and temperament in guide dogs. **Applied Animal Behaviour Science** 72, 347-364. 2001.
- SOTO FRM, VIANA WG, MUCCIOLO GCB, HOSOMI FYM, VANUCCHI CI, MAZZEI CP, EYHERABIDE AR, DE FÁTIMA LUCIO C, DIAS RA, AZEVEDO SS. **Evaluation of efficacy and safety of zinc gluconato associated with dimethyl sulphoxide for sexually mature canine males chemical neutering.** *Reprod Dom Anim* 2009;44:927-31.
- SOTO FRM, VIANA WG, SOUSA AJ, PINHEIRO SR, MUCCIOLO GB, HOSOMI FYM, AZEVEDO SS, DIAS RA, 2007: **Evaluation of zinc gluconate, either associated or not to dimethyl sulfoxide, as contraceptive method for male dogs.** *J Anim Reprod* 4, 119–124.
- TALWAR GP, NAZ RK. **Immunological control of male fertility.** *Arch Androl*, 1981;7:177 - 85
- TEPSUMETHANON V, WILDE H, HEMACHUDHA T. **Intratesticular injection of a balanced zinc solution for permanent sterilization of dogs.** *J Med Assoc Thailand* 2005;88:686-9.
- TRHALL, M.A. **Hematologia e Bioquímica Clínica veterinária.** Roca, 2007.
- TUDURY, EA, POTIER, GMA. **Tratado de Técnica Cirúrgica.** 2009. São Paulo, Ed. MedVet. p.293-295.
- WANG M. **Neutersol: from laboratory to market.** In: Second International Symposium on Non-surgical Methods for Pet Population Control; 2004, p.165-9.
- WANG, M. Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs. In: Proceedings of the International Symposium on nonsurgical methods for pet population control. p.62-65, 2002.

CONCLUSÕES GERAIS

A modulação da resposta ao estresse e a dor é altamente variável, e depende da experiência individual, do grau do estímulo estressor, da idade e da forma como o cão se relaciona com o ambiente, entre outros fatores. Não existe ainda, um parâmetro específico para avaliação do estresse, embora o cortisol seja considerado bastante sensível e universalmente aceito, sendo ainda, o mais utilizado para este propósito. É importante considerar o tipo de estressor ao qual o animal será submetido, o tempo de estímulo, o tipo de amostra a se coletar e a manipulação do animal, além de se associar mais de um parâmetro, para que se minimizem as influências externas e a avaliação seja mais próxima da realidade.

Os biomarcadores utilizados no presente trabalho mostraram-se sensíveis para a identificação do estresse. Foi observado que a esterilização por meio de injeção intratesticular de gluconato de zinco é um procedimento que causa desconforto ou dor leve, semelhante ao observado no procedimento convencional da orquiectomia. Assim, esta técnica pode ser utilizada na rotina da clínica de pequenos animais, bem como em programas de controle populacional.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle da fertilidade do cão macho é necessário não apenas para evitar coberturas indesejadas, mas também por uma importante questão de saúde pública. Além de pensar no bem estar animal, evitando estratégias de extermínio que atualmente são consideradas ineficientes. A esterilização química de cães machos tem sido bastante discutida, e muito polemizada em relação ao desconforto gerado aos animais. Neste trabalho foi possível observar que o desconforto gerado pela técnica é equivalente ao observado na orquiectomia, utilizada na rotina clínica de pequenos animais. Além de ser economicamente viável, tratar-se de uma técnica menos invasiva e mais segura para o animal.

ANEXO I

ESCALA DE DOR DE MELBOURN

CATEGORIA	DESCRIÇÃO	VALOR
1 - PARÂMETROS FISIOLÓGICOS:		
a-	fisiologicamente normal	0
b-	pupilas dilatadas	2
c- escolha apenas uma	% de aumento da FC comparada com a pré-operatória > 20% > 50% > 100%	1 2 3
d- escolha apenas uma	% de aumento da FR comparada com a pré-operatória > 20% > 50% > 100%	1 2 3
e-	temperatura retal acima da de referência	1
f-	Salivação	2
2 - RESPOSTA À PALPAÇÃO		
escolha apenas uma	sem alterações para a pré-operatória	0
	defesa/reação # quando à palpação	2
	defesa/reação # antes da palpação	3
3- ATIVIDADE		
escolha apenas uma	em repouso: dorme	0
	em repouso: semiconsciente	0
	em repouso: alerta	1
	Come	0
	Deprimido	2
	Rolling	3
4- ESTADO MENTAL ☒		
escolha apenas uma	Submissivo	0
	Amigável	1
	Desconfiado	2
	Agressivo	3
5 - POSTURA		
a-	defende e protege a área afetada (inclui posição fetal)	2
b- escolha apenas uma	decúbito lateral	0
	decúbito esternal	1
	sentado e estático, cabeça levantada	1
	estático, cabeça pendente	2
	em movimento	1
	postura anormal (ex. posição de reza ou curvado)	2
6 - VOCALIZAÇÃO ¶		
escolha apenas uma	não vocaliza	0
	vocalização quando manipulado	2
	vocalização intermitente	2
	vocalização constante	3

ANEXO II

QUESTIONÁRIO DO PROPRIETÁRIO PARA AVALIAÇÃO DA DOR DO ANIMAL APÓS O PROCEDIMENTO.

NOME: _____

DATA: ___/___/___

RAÇA: _____

IDADE: _____

PROPRIETÁRIO: _____

1- Ao chegar do procedimento em casa, o seu animal estava:

- normal
- quieto
- deprimido
- agitado

2- Como seu animal se comporta ao se levantar?

- calmo
- chorando
- incomodado
- quer mexer nos testículos

3- Quando chegou em casa, o animal quis comer:

- logo que chegou
- só a noite
- só no dia seguinte da castração
- não teve apetite

4- O animal urinou:

- logo que chegou
- só a noite
- só no dia seguinte da castração
- não urinou

5- O animal defecou:

- logo que chegou
- só a noite
- só no dia seguinte da castração
- não defecou

6- Se você tentar tocar no local da castração:

- o animal não se incomoda

- ele tenta se proteger
- ele chora
- ele tenta morder/fica agressivo

7- O seu animal dormiu bem durante a noite?

- sim
- não, ficou agitado
- não, chorou muito

8- Você acha que o seu animal sentiu:

- dor leve
- dor moderada
- dor intensa
- não sentiu dor

9- Se o seu animal sentiu dor/desconforto, você acha que foi:

- só no dia do procedimento
- só no dia seguinte ao procedimento
- por 3 dias ou mais

ANEXO III



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

TERMO DE CIÊNCIA E AUTORIZAÇÃO

Eu, _____, proprietário do animal da espécie canina, _____, raça _____, sexo masculino, de _____ anos de idade, ESTOU CIENTE de que o meu animal fará parte do estudo de avaliação do estresse na castração química, intitulado “Avaliação da Resposta Comportamental, Hematológica e Bioquímica Relacionada ao Estresse de Cães Submetidos à Esterilização Química por Meio de Injeção Intratesticular de Solução à Base de Zinco.” Desenvolvido no Departamento de Reprodução Animal da UFRPE, sob responsabilidade da Prof^a Dr^a Erika Christina Santos Oliveira.

Apesar de estudos sugerirem que o gluconato de zinco não produz efeito alérgico perceptível, existem relatos de dor em diversos agentes químicos utilizados para contracepção, assim, entendo que após o procedimento, meu animal poderá sentir dor/desconforto, ou apresentar ulceração escrotal, devendo comunicar ao grupo qualquer alteração que venha a ocorrer com o mesmo.

Outrossim, além de ciente, AUTORIZO por escrito que o animal de minha responsabilidade, seja incluído no referido projeto, e que tomei ciência de que o mesmo será submetido à CASTRAÇÃO QUÍMICA.

Recife, ____ de _____ de 2013.

Assinatura: _____

RG: _____

ANEXO IV

Tabela 4 – Variação da pontuação obtida através da utilização da Escala de dor da Universidade de Melbourn em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química

Fase Experimental	Tratamento		
	Controle (G1)	Cirúrgico (G2)	Químico (G3)
M0	3,00 ± 0,53	3,43 ± 0,45	4,00 ± 0,45
M1	8,20 ± 0,53	7,71 ± 0,45	7,57 ± 0,45
M2	4,25 ± 0,48 ^B	6,83 ± 0,60 ^A	4,57 ± 0,57 ^B
M3	4,40 ± 0,53	5,43 ± 0,45	4,29 ± 0,45
M4	4,80 ± 0,53	5,57 ± 0,45	4,29 ± 0,45

OBS. Letras diferentes na mesma linha indicam que $P < 0,05$ pelo teste de Tukey

Tabela 5 – Variação na concentração plasmática de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química

Fase Experimental	Tratamento		
	Controle (G1)	Cirúrgico (G2)	Químico (G3)
M0	3,10 ± 1,85	3,77 ± 1,56	3,58 ± 1,72
M1	16,13 ± 1,85	16,14 ± 1,56	10,74 ± 1,56
M2	5,02 ± 1,30 ^B	19,00 ± 2,62 ^A	17,32 ± 3,62 ^A
M3	2,19 ± 2,11	4,23 ± 1,56	7,76 ± 1,72
M4	2,83 ± 1,85	3,10 ± 1,71	2,60 ± 1,56

OBS. Letras diferentes na mesma linha indicam que $P < 0,05$ pelo teste de Tukey

Tabela 6 – Variação na contagem de neutrófilos ($\times 10^3 \mu\text{g/dL}$) em cães submetidos à esterilização cirúrgica e química

Fase Experimental	Tratamento		
	Controle (G1)	Cirúrgico (G2)	Químico (G3)
M0	$6,35 \pm 0,85$	$7,15 \pm 0,72$	$6,11 \pm 0,79$
M1	$8,08 \pm 0,85$	$6,74 \pm 0,72$	$6,87 \pm 0,72$
M2	$7,27 \pm 0,85$	$7,24 \pm 0,72$	$7,37 \pm 0,72$
M3	$5,68 \pm 1,04^B$	$9,24 \pm 1,05^A$	$10,26 \pm 1,16^A$
M4	$5,50 \pm 0,85$	$6,87 \pm 0,72$	$6,24 \pm 0,72$

OBS. Letras diferentes na mesma linha indicam que $P < 0,05$ pelo teste de Tukey