



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO *STRESS* DE GATAS HOSPITALIZADAS NO PERÍODO  
PÓS-CIRÚRGICO EM DISTINTAS CONDIÇÕES DE MACROAMBIENTE

MARISA DOS REIS GIRÃO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ilda Maria Neto Gomes Rosa

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

ORIENTADOR

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

CO-ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2016

LISBOA

---





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO *STRESS* DE GATAS HOSPITALIZADAS NO PERÍODO  
PÓS-CIRÚRGICO EM DISTINTAS CONDIÇÕES DE MACROAMBIENTE

MARISA DOS REIS GIRÃO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ilda Maria Neto Gomes Rosa  
Doutor Luis Miguel Alves Carreira  
Doutora Lisa Alexandra Pereira Mestrinho

ORIENTADOR

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

CO-ORIENTADOR

Doutor George Thomas Stilwell

2016

LISBOA

---

*A mim,*

Porque não existe melhor representação de todas as  
pessoas, experiências e momentos que, de alguma  
forma, foram (e são) relevantes na minha vida

## OS MAIS SINCEROS AGRADECIMENTOS

---

Esta etapa final representa a realização de um sonho, de uma teimosia. Apesar de ser uma conquista individual, devo muito a algumas pessoas especiais.

À minha família. Pelo apoio incondicional, por presenciarem os momentos mais aflitivos do curso e me ajudarem a não os transparecer e a superá-los. Como apêndice, ao meu gato, por ser a criatura *stressada* que é e pela companhia constante.

Aos meus amigos mais antigos. Se uma amizade que dure mais de sete anos tem a tendência de ser para toda a vida, então que não sejamos nós a estragar a estatística.

Aos amigos e colegas de curso. Dizem que os anos de faculdade são os melhores. Obrigada pelos momentos e experiências que ajudaram a fazer jus a esta afirmação.

À minha madrinha e ao meu padrinho. Porque o estudo não teria sido o mesmo sem os conselhos em notinhas, os sacos cheios de dossiês e os CDs com gigas de informação.

Aos meus afilhados. Por me darem a responsabilidade tão compensadora de ter pessoas para apoiar e serem um motivo de orgulho.

Às pessoas com quem estagiei. Porque podemos não ser o melhor grupo em termos académicos, mas somos com certeza o melhor a nível de amizade, união e colaboração. Tenho a plena noção que fiz amigos que vão durar e passar a meta dos sete anos.

A todo o pessoal do hospital, desde médicos, enfermeiros, auxiliares, técnicos, alunos e rececionistas. Não tenho como agradecer o apoio imenso prestado. Um especial obrigada ao Dr. Rodrigo Bom, por me ter permitido ser a sua *sidekick* e me ter ensinado tanto; ao Dr. Gonçalo Vicente, apesar de não ser oficial sempre foi o meu co-mentor; e à Dra. Leonor Iglésias, pela sintonia e por muito mais que a ajuda neste projeto.

Ao prof. Miguel Carreira. Por ser mais que o necessário num orientador, pela completa disponibilidade e pelos conselhos médico-veterinários e pessoais. Ao prof. George Stilwell. Por ter aceite o desafio de ser meu co-orientador, apesar de não ser a sua área, e pela total acessibilidade.

À prof. Berta São Braz. Pela constante preocupação e pela porta sempre aberta. À prof. Ana Duarte. Pela simpatia e pelo completo apoio numa área que não domino. Ao prof. Telmo Nunes. Pela vontade em ajudar e por me ter tornado numa *nerd* da estatística.

Ao Laboratório de Endocrinologia Veterinária da FMV, nomeadamente à Porf. Luísa Mateus e à Dra. Adriana Alberto. Por me terem ajudado com toda a simpatia quando começava a desesperar com um dos aspetos mais importantes do estudo.

À DRG<sup>®</sup>, especialmente à Stefanie Lamers. Por ter possibilitado a luz ao fundo do túnel, quando todas as portas se fechavam, e por ter acreditado no meu projeto. À Arium, em particular à Alexandra Silva. Por ter propiciado que tudo acontecesse de forma rápida e pela ajuda, quando tudo parecia demasiado complicado.

## RESUMO

---

### AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO *STRESS* DE GATAS HOSPITALIZADAS NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO EM DISTINTAS CONDIÇÕES DE MACROAMBIENTE

Ao longo das últimas décadas, a população de gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) teve uma evolução muito favorável. Porém, parte recebe poucos ou nenhuns cuidados médico-veterinários, principalmente devido ao comportamento demonstrado pelo animal no centro de atendimento médico-veterinário. De modo a minimizar este problema, as características ambientais devem ser adaptadas às particularidades da espécie. Considerando que as condições do macroambiente recomendadas na literatura para gatos hospitalizados não se encontram validadas cientificamente, com o presente estudo procurou-se confirmar as vantagens de alguns dos parâmetros ambientais no *stress* experienciado pelos doentes. Assim, uma amostra de 33 (N=33) fêmeas da espécie felina, previamente submetidas a ovariectomia, foi avaliada no período pós-operatório relativamente ao comportamento, frequência respiratória e concentração plasmática de cortisol em diferentes condições ambientais. Concluiu-se que a intensidade sonora é um dos fatores com maior relevância na amplitude de resposta ao *stress*. O tipo de luz (natural ou artificial) e a diferença de cerca de 1 °C na temperatura ambiental não aparentou ter influência no sistema de resposta ao *stress*, quando comparado com os outros parâmetros. A interferência concreta de odores adversos não pôde ser apreendida diretamente neste estudo. Adicionalmente, a frequência respiratória revelou ser um marcador excelente para evidenciar comportamentos de bloqueio na espécie felina. Os resultados da concentração plasmática de cortisol não foram concordantes com os das restantes variáveis, possivelmente devido à influência de acontecimentos *stressantes* no período prévio ao do protocolo experimental.

**Palavras-chave:** gato; *stress*; macroambiente; hospitalização; etograma; concentração de cortisol; frequência respiratória

## ABSTRACT

---

### ASSESSMENT OF THE STRESS RESPONSE OF CATS HOSPITALIZED IN THE POST-SURGICAL PERIOD IN DIFFERENT MACROENVIRONMENT CONDITIONS

Over the past decades, the population of domestic cats (*Felis silvestris catus*) had a very favorable evolution. However, part receive little or none medical veterinary care, mainly due to the behavior shown by the animal in the center of medical veterinary care. In order to minimize this problem, the environmental characteristics must be adapted to the particularities of the species. Whereas the macroenvironment conditions recommended in the literature for hospitalized cats aren't scientifically validated, the present study sought to confirm the advantages of some of the environmental parameters in the stress experienced by patients. Therefore, a sample of 33 (N=33) female feline species, previously undergoing ovariohysterectomy, was evaluated in the postoperative period for behavior, respiratory rate and plasmatic cortisol concentrations in different environmental conditions. It was concluded that loudness is one of the factors that has the greatest relevance in the stress response amplitude. The type of light (natural or artificial) and the difference of about 1 °C in the environment temperature had no apparent effect on the stress response system compared with the other parameters. The actual interference of adverse smells couldn't be directly inferred from this study. In addition, the respiratory rate was found to be an excellent marker to show freezing behavior in feline species. The results of plasmatic cortisol concentration were not consistent with those in other variables, possibly due to the influence of stressful events in the period prior to the experimental protocol.

**Key words:** *cat; stress; macroenvironment; hospitalization; ethogram; cortisol concentration; respiratory rate*

## ÍNDICES

---

### ÍNDICE DE CONTEÚDOS

Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Índices .....	v
Índice de conteúdos .....	v
Índice de figuras .....	vii
Índice de tabelas .....	vii
Índice de gráficos .....	vii
Lista de siglas e abreviaturas .....	viii
Lista de símbolos .....	x
Nota introdutória .....	1
Parte I - Relatório das atividades de estágio .....	3
Parte II – Revisão literária .....	5
O <i>stress</i> .....	5
Conceitos e definições .....	5
<i>Stress</i> ambiental .....	7
Resposta biológica ao <i>stress</i> .....	9
Avaliação e quantificação .....	11
Comportamento .....	13
Neuroetologia .....	13
Indicadores de <i>stress</i> .....	14
Etograma de <i>stress</i> .....	16
Cortisol .....	18
Ciclo biológico .....	18
Efeitos fisiológicos em <i>stress</i> .....	19
Medição da concentração de cortisol .....	20
Frequência respiratória .....	23
Regulação neurológica da ventilação .....	23
Como marcador de <i>stress</i> .....	24
Fatores modeladores do srs .....	25
Sistema de retroalimentação negativa .....	25
Inibição neurológica .....	25
Consequências do <i>stress</i> .....	26
Efeitos deletérios .....	26
Período pós-operatório .....	27

Ambiente do CAMV .....	28
Condições no internamento .....	28
Parte III – Avaliação da resposta ao <i>stress</i> .....	31
Materiais e métodos .....	31
Amostra em estudo.....	31
Terapêutica e técnica cirurgica .....	32
Acomodações.....	33
Descrição do protocolo experimental .....	33
Análise estatística .....	36
Resultados .....	38
Discussão.....	44
Conclusão.....	47
Referências bibliográficas .....	49
Anexos.....	55
Anexo I – casuística discriminada nos serviços de cirurgia, imagem e medicina interna .	55
Anexo II – <i>Cat-stress-score</i> (Kassler & Turner, 1997).....	67
Anexo III - Curvas padrão dos sistemas ELISA EIA-1887 utilizados.....	69

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama ilustrativo da interação entre duração (eixo horizontal) e intensidade (eixo vertical). <i>Fonte: adaptado de Johnstone, Reina e Lill (2012)</i> .....	7
Figura 2 – Ilustração de expressões faciais do gato. <i>Fonte: Overall et al., 2004</i> .....	16
Figura 3 – Ilustração de posturas corporais do gato. <i>Fonte: Overall et al., 2004</i> .....	16

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Etograma desenvolvido para o estudo .....	34
Tabela 2 - Características amostrais dos valores registados pelos observadores e resultado da aplicação do coeficiente de correlação intraclasse (ICC) .....	38
Tabela 3 – Características amostrais e resultado do teste Shapiro-Wilk em ambas .....	39
Tabela 4 - Características amostrais do Etog e da FR em ambos os grupos nos diferentes tempos.....	40
Tabela 5 - Características amostrais da [Cort] <sub>p</sub> em ambos os grupos nos diferentes tempos .....	40
Tabela 6 – Valores do teste de Shapiro-Wilk; Indicação da análise estatística utilizada na comparação entre divisões e resultado sequente .....	41
Tabela 7 – Resultados obtidos com a aplicação do <i>post-hoc</i> não paramétrico de DSCF .....	41
Tabela 8 - Características amostrais e resultado do teste Shapiro-Wilk para totalidade de dados das variáveis em T3 .....	42
Tabela 9 – Resultado do coeficiente de correlação de Spearman (Rho) entre os marcadores de <i>stress</i> utilizados .....	43

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição percentual de horas do estágio curricular por serviço do HEV-FMV .3	
Gráfico 2 – Distribuição em <i>boxplot</i> dos dados do peso da amostra em estudo.....	31
Gráfico 3 – Distribuição em <i>boxplot</i> dos dados da idade da amostra em estudo.....	31
Gráfico 4 – Valores registados pelos observadores nas diferentes categorias do etograma e soma das apresentações (Total).....	38
Gráfico 5 – Bland-Altman plot dos resultados obtidos com a técnica ELISA quimiluminescente laboratorial (A) e o sistema ELISA EIA-1887 (B).....	39
Gráfico 6 - Dispersão comparativa entre os dados de Etog e [Cort] <sub>p</sub> em T3.....	43
Gráfico 7 - Dispersão comparativa entre os dados de FR e [Cort] <sub>p</sub> em T3 .....	43
Gráfico 8 - Dispersão comparativa entre os dados de FR e Etog em T3 .....	43

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>[Cort]<sub>p</sub></b>	Concentração plasmática de cortisol
<b>ACTH</b>	Adrenocorticotrofina ( <i>adrenocorticotropic hormone</i> )
<b>AVP</b>	Arginina vasopressina
<b>CA</b>	Centro apneustico
<b>CAMV</b>	Centro de atendimento de medicina veterinária
<b>CBG</b>	Transcortina ( <i>corticosteroid-binding globulin</i> )
<b>CHCM</b>	Concentração de hemoglobina corpuscular média
<b>CIF</b>	Cistite idiopática felina
<b>CP</b>	Centro pneumotácico
<b>CRF</b>	Fator de libertação da corticotropina ( <i>corticotropin releasing factor</i> )
<b>CSS</b>	<i>Cat-stress-score</i>
<b>DSCF</b>	<i>Post-hoc</i> de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<b>Etog</b>	Etograma
<b>FEDIAF</b>	Indústria Europeia de Alimentação de Animais de Estimação ( <i>The European Pet Food Industry</i> )
<b>FR</b>	Frequência respiratória
<b>GC</b>	Grupo de controlo
<b>GE</b>	Grupo de estudo
<b>GnRH</b>	Hormona de libertação da gonadotrofina ( <i>gonadotropin-releasing hormone</i> )
<b>GRD</b>	Grupo respiratório dorsal
<b>GRV</b>	Grupo respiratório ventral
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular média
<b>Hct</b>	Hematócrito
<b>HEV-FMV</b>	Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa
<b>HPA</b>	Hipotálamo-hipofisário-adrenocortical ( <i>hypothalamic-pituitary-adrenal</i> )
<b>ICC</b>	Coeficiente de correlação intraclasse ( <i>intraclass correlation coefficient</i> )
<b>IPR</b>	Índice de produção de reticulócitos
<b>LC</b>	<i>Locus caeruleus</i>
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baixa densidade ( <i>low-density lipoprotein</i> )
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>N:L</b>	Rácio neutrófilo para linfócito
<b>NPV</b>	Núcleo paraventricular
<b>OVH</b>	Ovariohisterectomia

<b>RG</b>	Recetor de glucocorticoides
<b>RM</b>	Recetor de mineralcorticoides
<b>SAG</b>	Síndrome de adaptação geral
<b>SEm</b>	Erro padrão da média
<b>SNA</b>	Sistema nervoso autónomo
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNS</b>	Sistema nervoso simpático
<b>SRS</b>	Sistema de resposta ao <i>stress</i>
<b>VCM</b>	Volume corpuscular médio

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>&lt;</b>	Inferior
<b>=</b>	Igual
<b>&gt;</b>	Superior
<b>±</b>	Desvio do valor (mais ou menos)
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>µg/kg</b>	Micrograma por quilograma
<b>cm</b>	Centímetros
<b>dB</b>	Decibéis
<b>IM</b>	Intramuscular
<b>kg</b>	Quilogramas
<b>mg/kg</b>	Miligrama por quilograma
<b>ng/ml</b>	Nanogramas por mililitros
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>rpm</b>	Respirações por minuto
<b>SC</b>	Subcutânea
<b>α</b>	Nível de significância
<b>ρ</b>	Coeficiente de correlação de Spearman

## NOTA INTRODUTÓRIA

---

Ao longo das últimas décadas, a popularidade do gato (*Felis silvestris catus*) como animal de estimação teve uma evolução muito favorável, sendo que, em alguns países, a espécie suplanta o número de cães nas mesmas condições (Bayer HealthCare, 2013). Segundo os dados da Indústria Europeia de Alimentação de Animais de Estimação (FEDIAF – do inglês *The European Pet Food Industry*), no período entre 2012 e 2014 verificou-se um crescimento de 10,5% da população de gatos domésticos em toda a Europa. Este facto justifica-se principalmente pela adaptabilidade da espécie felina ao recente estilo de vida da sociedade moderna, caracterizando-se por serem relativamente independentes e capazes de ajustar a sua vivência a espaços modestos, como os apartamentos (Beaver, 2003).

Contudo, a generalidade dos gatos recebe poucos ou nenhuns cuidados médico-veterinários, especialmente os de carácter preventivo. Os motivos apontados pelos donos centram-se, em particular, no comportamento demonstrado pelo animal em resposta ao *stress* a que é sujeito no ambiente do centro de atendimento de Medicina Veterinária (CAMV) (Rodan, 2016).

O processo de domesticação do gato é relativamente recente, existindo ainda evidência de elevada semelhança genética com as espécies silvestres (Casey & Bradshaw, 2007; O'Brien & Johnson, 2007). A nível comportamental, estes animais mantêm características análogas às dos seus antepassados. Assim, os felinos apresentam natureza de predador e, em simultâneo, de presa, reagindo de modo reativo e intenso a estímulos desconhecidos como, por exemplo, a manipulação básica realizada durante o exame físico (Galac *et al.*, 2010; Overall, 2013). Desta forma, as principais dificuldades na manipulação da espécie, reportadas por Médicos Veterinários e proprietários, são consequência da resposta de defesa natural do gato a ambientes imprevisíveis, associada à reduzida compreensão da conduta deste (Rodan, 2016).

De modo a minimizar este problema, toda a equipa incorporada no CAMV deve possuir formação no âmbito de medicina comportamental, com o intuito de reduzir o *stress* a que o gato é submetido, estabelecendo-se uma relação proprietário-animal-veterinário mais vantajosa (Rodan *et al.*, 2011). Alguns CAMV já adotaram técnicas que respeitam o carácter da espécie felina, havendo, contudo, um elevado predomínio dos que continuam em progresso lento nesta direção. Aliado a esta realidade, a maioria dos Médicos Veterinários não adquire competências específicas sobre comportamento felino durante a sua formação básica (Bayer Healthcare, 2013; Overall *et al.*, 2004).

Poucos são ainda os estudos que potenciam a compreensão do bem-estar do gato, sendo de elevado interesse direccionar a investigação para otimizar o ambiente onde este se encontra, em oposição aos requisitos mínimos para a sua sobrevivência (Casey & Bradshaw, 2007). Ponderando que as atuais recomendações ambientais para a espécie se

baseiam maioritariamente na experiência empírica, sendo por isso consideradas apenas indicações gerais (Stella & Buffington, 2016), o principal objetivo da presente dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária será a validação científica das condições de internamento hospitalar descritas na literatura orientadora. Para tal, realizou-se a avaliação e comparação da resposta ao *stress* de gatas jovens submetidas a um procedimento cirúrgico eletivo de rotina do tipo ovariohisterectomia (OVH) e colocadas em recuperação em distintos ambientes de internamento, no período peri-operatório imediato. Uma revisão bibliográfica sumária sobre o assunto abordado é primariamente apresentada, de modo a fornecer ao leitor o contexto da investigação realizada.

*“Cats are much easier (and more fun) to work with when they look forward  
to being handled”*

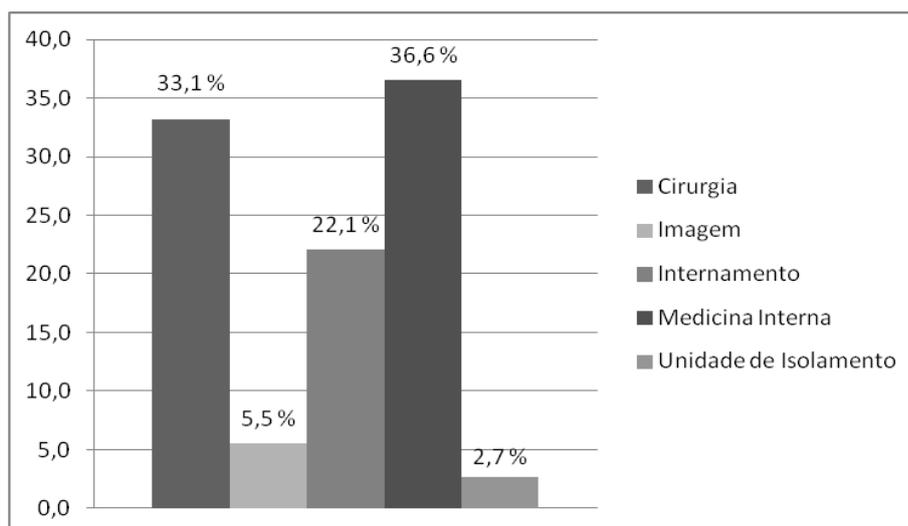
- Judith L. Stella and C. A. Tony Buffington

## PARTE I - RELATÓRIO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO

O estágio curricular foi realizado nas áreas de Medicina e Cirurgia de pequenos animais e exóticos no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HEV-FMV), decorrendo no período compreendido entre setembro de 2015 e abril de 2016, com um total de 1268 casos e 1304 horas, excluindo tempo extraordinário.

O sistema de organização das atividades baseou-se na rotatividade mensal pelos serviços de Cirurgia, Imagem, Internamento, Medicina Interna e Unidade de Isolamento, estando a contabilização percentual de horas por secção especificada no Gráfico 1 e a casuística discriminada no Anexo I. A generalidade das funções exercidas durante o estágio foram supervisionadas e acompanhadas por médicos, enfermeiros, auxiliares e/ou professores, sendo estas integradas com o trabalho escolar prático de alunos do 3º, 4º e 5º anos do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária.

**Gráfico 1** – Distribuição percentual de horas do estágio curricular por serviço do HEV-FMV



### **CIRURGIA** (432 horas; 292 casos)

Neste serviço, os estagiários são responsáveis pela confirmação dos requisitos cirúrgicos, receção do animal, preenchimento da ficha de internamento, cateterização venosa do doente, cálculo, preparação e administração da terapêutica médica pré-anestésica e indutor anestésico, entubação endotraqueal, monitorização anestésica, bem como tricotomia, limpeza e assepsia do campo cirúrgico. No decurso da operação, os mesmos alternam em circulante, anestesista, ajudante de cirurgião e cirurgião. No pós-operatório, os estagiários estão encarregues da vigia da recuperação anestésica, informação geral telefónica aos proprietários, planeamento terapêutico e especificação dos cuidados médicos, consoante a intervenção.

**IMAGEM** (72 horas; 249 casos)

No HEV-FMV o diagnóstico por imagem pode ser realizado principalmente através de radiografia digital, tomografia computadorizada e ecografia. A secção radiológica proporciona a aprendizagem prática do posicionamento animal, colimação do feixe primário e utilização de programa informático para interpretação das radiografias efetuadas. No exame tomográfico, o estagiário participa na cateterização venosa, indução e monitorização anestésica, posicionamento correto, acompanhamento no recobro e discussão das imagens obtidas. Por fim, o serviço de ecografia possibilita a preparação e contenção do paciente, iniciação do exame, assistência em procedimentos ecoguiados e análise dos diagnósticos diferenciais.

**INTERNAMENTO** (288 horas; 207 casos)

No início de cada turno, são expostos os casos presentes na unidade e esclarecidas dúvidas sobre tratamento, curso clínico e plano posterior. As atividades no internamento do HEV-FMV propiciam a autonomização, assim como o desenvolvimento da capacidade de organização e gestão do trabalho atribuído. O estagiário é incumbido da monitorização dos animais, cuidados básicos de higiene e bem-estar, estruturação e explicação da alta aos proprietários, preparação e administração de medicamentos, tratamento fisioterapêutico, determinação da taxa de fluidoterapia, medição de curvas de glicémia, colheita de amostras biológicas, e outros serviços de enfermagem.

**MEDICINA INTERNA** (477 horas; 552 casos)

Esta secção compreende consultas de medicina geral, preventiva e de especialidade, nomeadamente de animais exóticos, cardiologia, dermatologia, neurologia, oftalmologia, oncologia, ortopedia e traumatologia, bem como casos de referência. O contacto direto com os proprietários permite aperfeiçoar as competências de comunicação, especialmente na área da recolha de informação e expressão técnica simples, de modo a ser compreensível. No decorrer das consultas, os estagiários são responsáveis pelo começo e condução da mesma, apuramento da história pregressa, realização do exame físico global e específico, exposição de diagnósticos diferenciais, estabelecimento do plano de diagnóstico e terapêutico, bem como diversos serviços de enfermagem, elaboração e explicação do esquema vacinal ou de desparasitação, preparação e administração parental de fármacos.

**UNIDADE DE ISOLAMENTO** (35 horas; 23 casos)

Neste serviço, destinado ao alojamento de animais com doenças infectocontagiosas, o estagiário é encarregue da maioria das atividades descritas na área de internamento, conquanto em ambiente controlado, de segurança biológica elevada. São também efetuadas neste recinto técnicas cirúrgicas simples, que não necessitem de anestesia prolongada.

## PARTE II – REVISÃO LITERÁRIA

---

### O STRESS

Apesar da designação ‘*Stress*’ ser relativamente recente, o seu conceito e efeitos foram já mencionados na Grécia antiga por algumas entidades notórias como Aristóteles ou Hipócrates, ainda que de modo abstrato (Fink, 2010).

Em 1859, Claude Bernard referiu pela primeira vez que os seres vivos apresentavam independência das influências diretas do meio exterior, sendo as células e os tecidos que os integram protegidos por um “meio interno”, que seria constituído principalmente pela componente líquida que circula no corpo. De acordo com o mesmo, o “meio interno” permitia a conservação de um estado estável e constante, autónomo do ambiente extrínseco, através de mecanismos que minimizavam alterações nas características biológicas do organismo (Fink, 2010; Goldstein & Kopin, 2007).

Posteriormente, Walter Cannon (1929) sugeriu o termo ‘Homeostasia’ (do grego *homoios* = similar e *stasis* = posição) para descrever os diferentes processos que, de uma forma coordenada, permitem manter vários valores fisiológicos dentro dos limites normais. Cannon (1929) concebeu também a resposta ‘luta ou fuga’ (do original *fight or flight*) perante o perigo, onde propõe a ativação do sistema nervoso simpático (SNS) e a alteração aguda da atividade da medula da glândula adrenal como mecanismo que permite ao indivíduo reagir de imediato perante uma ampla variedade de ameaças potenciais à sua homeostasia. De acordo com a pesquisa de Cannon, estes sistemas funcionam como uma unidade, sugerida como ‘Simpatoadrenal’ ou ‘Simpático-adrenal’ (Goldstein & Kopin, 2007). Esta reação de luta ou fuga seria posteriormente incluída na denominada ‘Síndrome de adaptação geral’ (SAG), postulada por Hans Selye, que surge como sendo a primeira fase da resposta geral do corpo ao *stress* (Fink, 2010).

Terá sido Selye que utilizou pela primeira vez a palavra *stress* com o enquadramento apresentado (Rosch, 1998). De acordo com as suas obras, “o *stress* é a resposta não específica do corpo a qualquer exigência” (Selye, 1976, p.15, tradução livre) e o organismo responde sempre com um padrão semelhante, em termos de alterações bioquímicas, funcionais e estruturais, quando exposto a diferentes ameaças ou eventos (Selye, 1976). Estas variações fisiológicas destinam-se, fundamentalmente, a lidar com o aumento das imposições na atividade biológica, sendo incluídas nas 3 fases globais do SAG, que surgem segundo a ordem: reação de alarme inicial; fase de adaptação ou resistência à agressão; e fase de exaustão, com eventual desfecho fatal (Goldstein & Kopin, 2007).

### CONCEITOS E DEFINIÇÕES

Devido a conclusões contraditórias à doutrina de homogeneidade na resposta a fatores agressores distintos de Selye, o termo *stress* continua atualmente sem uma descrição

abrangente adequada a todas as condições ou espécies, tendo por isso significados distintos para diferentes investigadores e situações (Fink, 2010; Kim & Diamond, 2002; Pácak *et al.*, 1998). Qualquer explicação terá de consignar a inexistência de uma única resposta fisiológica não específica e que o *stress* não é determinado pelos parâmetros físicos do estímulo, mas sim pela maneira como o indivíduo o percebe e reage. Considerando isto, Kim e Diamond (2002) sugeriram uma definição de *stress* aplicável transversalmente a várias espécies e paradigmas, constituída por 3 componentes. Primeiro, terá de ocorrer aumento da excitabilidade de modo a ser objetivamente mensurável através da atividade motora e neuroquímica ou com recurso à eletroencefalografia. Todavia, tal acontece também no seguimento de eventos aprazíveis, pelo que, em segundo, a experiência tem de ser reconhecida como aversiva, ou seja, o indivíduo terá de demonstrar intenção de evitar ou atenuar o estímulo a que está exposto. Por fim, o elemento de controlo, e resultante previsibilidade, destaca-se como a variável que determina a magnitude da agressão e a suscetibilidade do indivíduo em desenvolver, conseqüentemente, uma resposta (Fink, 2016). Desta forma, conclui-se que o *stress* corresponderá à estimulação excitatória decorrente de uma situação adversa, cujas conseqüências fisiológicas e magnitude serão grandemente influenciadas pela percepção de controlo da situação (Kim & Diamond, 2002).

Os agentes endógenos ou exógenos que perturbam a homeostasia são denominados ‘*Stressors*’, não existindo evidência científica de distinção concisa entre *stressors* físicos, que produzem alterações diretas observáveis, e psicológicos, que originam efeitos subtis e de difícil deteção (Armario *et al.*, 2012; Fink, 2010; Novak, Hamel, Kelly, Dettmer, & Meyer, 2013; Selye, 1976).

Hans Selye (1976) reconheceu que os mecanismos homeostáticos seriam insuficientes para garantir a manutenção dos sistemas num organismo sob condições de *stress*, propondo o termo ‘Heterostase’ (do grego *heteros* = outro) para identificar o processo pelo qual se estabelece um novo estado de equilíbrio. Embora impreciso, este viabilizou o aparecimento do conceito ‘Allostase’, elaborado por Sterling e Eyer em 1988, que significa “alcançar a estabilidade através da mudança” (Sterling & Eyer, 1988, p. 636, tradução livre; Fink, 2010). Resumidamente, a homeostasia refere-se aos mecanismos fundamentais para a preservação da vida, enquanto a alostasia integra os sistemas que propiciam a estabilidade desses, reajustando os parâmetros biológicos (Sterling and Eyer, 1988; Novak *et al.*, 2013). Assim, os procedimentos alostáticos regulam as variações fisiológicas subsequentes a um incidente *stressante* e cessam as alterações quando este termina, permitindo que o processo de adaptação predomine sobre as conseqüências prejudiciais (Fink, 2009; McEwen, 2009).

A condição intitulada de ‘Sobrecarga alostática’ resulta da sobre-exposição do corpo aos mediadores de *stress* na alostase, com efeito cumulativo e conseqüente exacerbação da

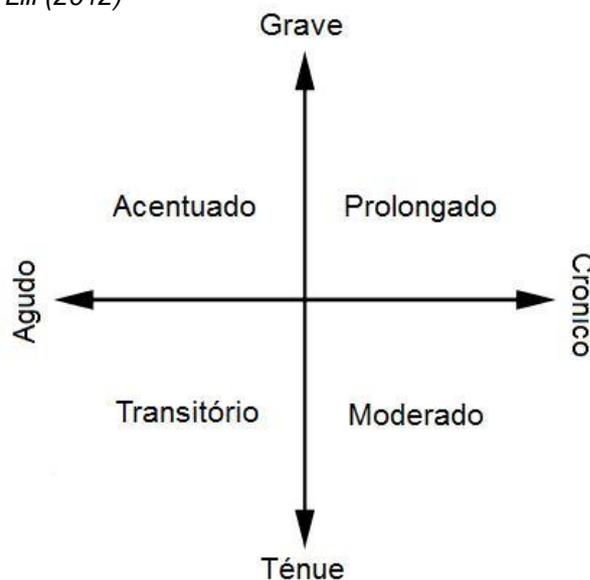
situação fisiopatológica (Novak *et al.*, 2013; Stewart, 2006). Este estado pode ser induzido por 4 hipóteses: (1) incapacidade em suspender os métodos de alostase; (2) resposta alostática inadequada de algum sistema, com amplificação compensatória de outros recursos; (3) incapacidade de habituação a desafios similares sucessivos; (4) *stress* frequente, intenso, prolongado ou nocivo. A sobrecarga alostática é desprovida de qualquer propósito útil e predispõe a doenças (Broom & Johnson, 2000; McEwen, 2005; McEwen, 2009; McEwen & Wingfield, 2003).

A conexão entre a extensão temporal do evento, da percepção do *stressor* e das resultantes perturbações cognitivas, comportamentais e fisiológicas permite distinguir *stress* em 'Agudo' (tipicamente inferior a 1 hora) e 'Crónico' (durante horas, dias a semanas). A intensidade da resposta, ou seja, o grau de alteração das propriedades do organismo, possibilita ainda a divisão em 'Ténue' ou 'Grave'. A interação entre intensidade e duração (Fig. 1) propicia a fragmentação do *stress* em pelo menos 4 níveis: transitório, acentuado, moderado ou prolongado (Johnstone, Reina & Lill, 2012).

Complementarmente, o *stress* agudo ocorre continuamente, com restauração célere da homeostasia, enquanto o crónico é um fenómeno ocasional, com repetições num determinado período (Sterling and Eyer, 1988; Novak *et al.*, 2013). Estes episódios de agudização são geralmente despoletados por exposição ou associação ao acontecimento pejorativo inicial (Mason, 1968; Nesse *et al.*, 1985). Na prática, a maioria das experiências consistem em combinações das características de ambos, sendo a diferenciação sempre ambígua e instável (Dougall & Baum, 2011).

Selye (1976) referiu ainda a impossibilidade de dividir *stress* em diferentes subtipos, aceitando-se este método apenas quando se pretende realçar um grupo de *stressors* específicos.

**Figura 1** - Diagrama ilustrativo da interação entre duração (eixo horizontal) e intensidade (eixo vertical). Fonte: adaptado de Johnstone, Reina e Lill (2012)



### STRESS AMBIENTAL

Este conceito exprime a complexa interação entre o ambiente e um sistema biológico a ele exposto, com resultante reação e adaptação às novas exigências impostas (Cairns, 2013; Lazarus & Cohen, 1977). No contexto da presente dissertação, a quantidade de novos estímulos presentes no CAMV, devido às circunstâncias não familiares, geralmente incitam nos animais respostas defensivas, geradas pelo medo e ansiedade, quando se pretende

efetuar diferentes procedimentos médicos ou de higiene (Cannon & Rodan, 2016; Lloyd, 2014; Stella & Buffington, 2016).

A hospitalização é uma experiência inevitável em determinadas situações da vida do gato. Contudo, este assume-a como uma ameaça à sua integridade e sobrevivência, devido à ativação do instinto de presa, quebra do laço territorial e gregário estabelecido com o seu lar, incapacidade de expressar o seu comportamento natural e falta de conforto à manipulação humana em virtude de um período crítico de sociabilização relativamente precoce, às 2-7 semanas (Rodan & Cannon, 2016; Rodan *et al.*, 2011; Stella & Buffington, 2016; Stella, Lord & Buffington, 2011). Os *stressors* que afetam os animais confinados nas enfermarias podem ser distribuídos em microambiente, macroambiente ou antropogénicos.

Os de microambiente relacionam-se com o aspeto da jaula em que o gato será mantido, ou seja, o substrato (grelha de plástico, liso em aço inoxidável, etc.), a sua área, a existência de esconderijos e de pontos altos, a apresentação e frequência da alimentação, as particularidades da liteira, entre outros.

Os de macroambiente referem-se às características do espaço onde a jaula se encontra, isto é, a luminosidade, o som, o odor e a temperatura. Curiosamente, apesar destes elementos sensoriais poderem constituir estímulos adversos consideráveis para a espécie, dos estudos gerais publicados sobre enriquecimento ambiental e bem-estar do gato poucos são os que investigam a influência do macroambiente (Morgan & Tromborg, 2007; Stella, Croney & Buffington, 2014).

A sensibilidade dos gatos à luz é relativamente elevada, devendo-se ponderar a intensidade, o tipo de iluminação (natural, fluorescente, incandescente, etc.) e o ciclo luz:escuro (Stella & Buffington, 2014). Normalmente, a fotoperiodicidade da enfermaria é mantida de acordo com as necessidades do humano, desconhecendo-se que a disrupção da sequência natural altera o ritmo circadiano intrínseco, causando *stress* (Morgan & Tromborg, 2007).

No internamento, o som pode ter como origem aparelhos eletrónicos, a presença de diferentes espécies (canídeos, felídeos, etc.) ou atividades humanas, variando cada fonte quanto à amplitude (Stella & Buffington, 2014). Níveis sonoros que transcendem os limites de conforto do gato, estabelecidos entre 20-55Hz e 78kHz, são assimilados como agressão, principalmente quando ocorrem com periodicidade irregular e amplitude média a alta (Beaver, 2003). Esta realidade é exacerbada pelo facto de as superfícies da generalidade das jaulas serem extremamente acústicas (Morgan & Tromborg, 2007).

Potenciais odores hostis para os gatos hospitalizados incluem químicos de lavagem e desinfeção, tabaco, antissépticos, cães, outros gatos, perfumes, aromas cítricos, entre outros (Morgan & Tromborg, 2007).

Adicionalmente, a temperatura é causa comum de desconforto para a espécie, já que os felinos preferem ambientes mais quentes do que a maioria dos animais (Stella & Buffington, 2014).

Para além dos mencionados na descrição do macroambiente, os *stressors* antropogénicos abrangem a proximidade forçada e imprevisível de seres humanos desconhecidos, o tráfego frequente e irregular, bem como a inconsistência de horários de alimentação, limpeza e manipulação (Morgan & Tromborg, 2007; Rodan & Cannon, 2016; Wielebnowski, Fletchall, Carlstead, Busso & Brown, 2002).

A maior parte dos estímulos citados são encontrados dispersos no circundante cosmopolita, visto que, um ambiente sem *stress*, é impossível (Lloyd, 2014). A principal diferença centra-se na incapacidade de controlo ou previsibilidade da duração, tempo ou natureza da incitação nos CAMV, desencadeando-se mecanismos de resposta ao *stress* (Marshall, Davis & Sherbourne, 1999; Morgan & Tromborg, 2007).

## RESPOSTA BIOLÓGICA AO *STRESS*

Quando os animais contactam com o meio têm a capacidade de captar o fluxo constante de nova informação através dos órgãos sensoriais (olfativo, auditivo, tátil, gustativo, visual e vomeronasal) (Carney *et al.*, 2012). Por meio dos nervos aferentes cranianos e raquidianos, estes sinais são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC), predominantemente até ao tálamo, sendo seguidamente encaminhados para regiões específicas do córtex cerebral para processamento da informação, onde esta é avaliada e comparada com experiências precedentes (Fink, 2016; Pacák & Palkovits, 2001; Stella & Buffington, 2014). Quando nenhuma ameaça é percebida, o indivíduo mantém o curso de ação inicial. Porém, se o contrário ocorrer, o sistema de resposta ao *stress* (SRS) é ativado, ou seja, são acionados mecanismos alostáticos psicológicos, comportamentais e fisiológicos, com o objetivo de restabelecer a homeostasia perdida (Stella & Buffington, 2014).

Nos mamíferos, o SRS é mediado por duas vias principais: o sistema nervoso autónomo (SNA), especialmente o SNS; e o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenocortical (HPA – do inglês *hypothalamic-pituitary-adrenal*). A intensificação de ambas vias depende do hipotálamo, particularmente: o núcleo paraventricular (NPV) no controlo do eixo HPA; o NPV aliado à área hipotalâmica lateral e núcleo infundibular na moderação do SNA (Fink, 2016; Pacák & Palkovits, 2001).

O SNA desempenha a função primária na resposta imediata, favorecendo principalmente a libertação de catecolaminas, como a noradrenalina dos terminais nervosos e a adrenalina das células cromafins da medula adrenal. Em consequência, verifica-se o aumento do débito e frequência cardíaca, da pressão sanguínea, do fluxo sanguíneo para os músculos esqueléticos, da síntese e disponibilização de glucose, bem como a potenciação da vigilância e da capacidade cognitiva (Casey & Bradshaw, 2007). Esta combinação de repercussões prepara o indivíduo para reagir, isto é, propicia o comportamento de luta ou fuga (Stella & Buffington, 2014). O SNA é coordenado e controlado no SNC pelo NPV

hipotalâmico, em associação com diversos núcleos do tronco cerebral e do sistema límbico (Fink, 2016).

Simultaneamente, o hipotálamo secreta o neuropéptido fator de libertação da corticotropina (CRF – do inglês *corticotropin releasing factor*), que é posteriormente transportado nos vasos porta hipotálamo-hipofisários para o lobo anterior da glândula hipofisária, onde induz a libertação de adrenocorticotrofina (ACTH – do inglês *adrenocorticotropic hormone*). A atividade deste fator é potenciada pela arginina vasopressina (AVP), igualmente produzida no NPV (Fink, 2016; Pacák & Palkovits, 2001). Por sua vez, a ACTH estimula o córtex da glândula adrenal, concretamente a zona fasciculada e reticular, promovendo a secreção de glucocorticoides, dos quais o cortisol é o mais prevalente. Estas hormonas são responsáveis por efeitos metabólicos que facilitam a resposta fisiológica e comportamental, bem como a regulação do SRS por diversos mecanismos de retroalimentação negativa (Stella & Buffington, 2014).

Adicionalmente, outros recursos neuroquímicos e circuitos nervosos determinam a reação central à agressão, incluindo as emoções, como medo ou inquietação, e a conduta consequente. Dos componentes nervosos distinguem-se o sistema límbico do prosencéfalo e o córtex pré-frontal, enquanto dos neuroquímicos destacam-se os neurotransmissores aminoácidos (glutamato e ácido gama-aminobutírico), os neuropéptidos (CRF e peptidos opióides) e as monoaminas (noradrenalina, serotonina e dopamina), que auxiliam coletivamente a sobrevivência do animal numa fase inicial (Fink, 2016; Jöels & Baram, 2009).

Pouco depois do evento *stressante* ocorrer, várias regiões cerebrais, como os núcleos da rafe, córtex pré-frontal e *locus caeruleus* (LC), sofrem estimulação e a proporção de monoaminas no SNC é amplificada. Este aumento é desencadeado diretamente por circuitos do cérebro envolvidos na função cognitiva (por exemplo a amígdala cerebelosa no caso do LC) ou indiretamente, pela ativação do SNS. Como exemplo de alguns dos efeitos das aminas biogénicas: a serotonina é fundamental na redução da ansiedade pós-traumática; a dopamina melhora a avaliação do risco e as estratégias de decisão; a noradrenalina excita os neurónios e promove a atenção (Fink, 2016; Joëls & Baram, 2009).

Parte da grande variedade das emoções e comportamentos em resposta ao *stress* é organizada por estruturas do sistema límbico, nomeadamente o hipocampo (da área cortical) e a amígdala (da área subcortical), e pelo córtex pré-frontal (Pacák & Palkovits, 2001). Estes elementos estão interligados, influenciando-se mutuamente indireta ou diretamente (McEwen, 2007).

Em conclusão, o SRS tem como finalidade a redução da exposição ou a adaptação do indivíduo a condições ambientais permutáveis, baseando-se em mecanismos complexos, interativos e, por vezes, excessivos (Pacák & Palkovits, 2001; Stella & Buffington, 2014).

## AVALIAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Das modificações resultantes da indução do SRS, apenas os processos comportamentais e fisiológicos possibilitam quantificar a intensidade do *stress* num organismo, visto que as modificações do foro psicológico não permitem avaliação direta ou objetiva (Nibblett, Ketzis & Grigg, 2015; Novak *et al.*, 2013).

A postura corporal e a conduta felina são indicadores fidedignos nesta espécie, sendo comum associar reações de defesa/agressão a eventos impetuosos e traços mais subtis a situações morosas (Nibblett *et al.*, 2015). Contudo, devido à individualidade subjacente, o mesmo nível de *stress* poderá despoletar diferentes idiosincrasias, consoante o temperamento, vivência ou património genético do animal (Casey & Bradshaw, 2007). No seguimento de perturbações ambientais, os gatos podem também exibir um conjunto de sinais clínicos e comportamentais não específicos, denominado por “comportamento doentio” (do original *sickness behavior*), em que os mais usuais incluem emese de pelos, comida ou bília, apetite caprichoso e periúria (Stella, Croney & Buffington, 2013). Apesar da origem concreta destas alterações ser ainda incógnita, estudos têm direcionado para citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 beta, a interleucina-6 e o fator de necrose tumoral, todas ativadas no SRS (Raison & Miller, 2003).

Os elementos fisiológicos têm como principal vantagem o facto de poderem ser quantificados diretamente. Porém, além da variação individual, ocorre flutuação circadiana, que dificulta a comparação e interpretação dos dados (Casey & Bradshaw, 2007). Adicionalmente, a recolha desta informação geralmente implica manipulação ou métodos invasivos, o que pode modificar as medidas de *stress* em poucos minutos (Johnstone *et al.*, 2012). Não obstante, os parâmetros métricos integram a pressão sanguínea, frequência cardíaca, frequência respiratória, perfil de leucócitos, contagem de reticulócitos, proteínas de *stress*, resposta à hormona de libertação da gonadotrofina (GnRH – do inglês *gonadotropin-releasing hormone*), catecolaminas, teste de estimulação com ACTH e cortisol.

O inconveniente da pressão sanguínea, demonstrado no estudo de Quimby, Smith e Lunn (2013), é a significativa oscilação refratada entre indivíduos, contrastando com as frequências cardíaca e respiratória, em que os incrementos revelaram maior consistência (Stella & Buffington, 2016). Ademais, para aferir quer a pressão sanguínea quer a frequência cardíaca é necessário o manuseamento do animal, pelo que, em alternativa, a taxa de ventilação aparenta ser um ótimo indicador reprodutível de *stress* (Casey & Bradshaw, 2007).

Relativamente ao perfil de leucócitos, o aumento da concentração de glucocorticoides leva à redistribuição dos linfócitos circulantes para outros compartimentos corporais (pele, baço, medula óssea e linfonodos), com conseqüente redução destes no sangue periférico. Adicionalmente, promove a elevação do número de neutrófilos, resultando no aumento do rácio neutrófilo para linfócito (N:L) na amostra estudada (Stella *et al.*, 2013). Contudo, é

essencial constatar que alterações no N:L podem verificar-se após, por exemplo, cirurgia e a semivida destas células é extensa (Herder & Prasse, 1972; Johnstone *et al.*, 2012).

A exposição repetida a ameaças restringidas no tempo potencia a libertação de reticulócitos no sangue circulante, resultando num hemograma típico, com o aumento do índice de produção de reticulócitos (IPR), do volume corpuscular médio (VCM) e, por vezes, também do hematócrito (Hct), bem como decréscimo da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e/ou da hemoglobina corpuscular média (HCM). No entanto, esta mudança apenas ocorre após várias horas, sendo um processo lento (Johnstone *et al.*, 2012).

Quanto às proteínas de *stress*, induzidas transitoriamente pelo eixo HPA, estas não variam com a manipulação e podem persistir consideravelmente mais do que os glucocorticoides. Todavia, a insuficiente investigação, relativa à tendência na resposta a acontecimentos adversos, justifica o uso limitado como marcador de *stress* (Johnstone *et al.*, 2012).

Nos animais submetidos a *stress* prolongado, o nível de cortisol conseqüente diminui a sensibilidade da hipófise anterior à GnRH, reduzindo a secreção da hormona luteinizante (LH). Desta forma, a medição da LH após administração de GnRH sintética permite determinar, indiretamente, as variações na produção de cortisol (Casey & Bradshaw, 2007).

Apesar de as catecolaminas constituírem hormonas importantes no SRS, a sua semivida no plasma é, meramente, de poucos minutos, o que justifica a escassez de estudos com resultados adequados (Möstl & Palme, 2002).

O *stress* pode ainda ser avaliado através de testes de estimulação com ACTH, já que a suscetibilidade da glândula adrenal pode aumentar após instigação crónica. Assim, a comparação da produção de cortisol, em resposta à ACTH, antes e depois do período de agressão possibilita obter uma diferença que será positivamente proporcional à intensidade da resposta (Armario *et al.*, 2012; Casey & Bradshaw, 2007).

Os glucocorticoides são diversas vezes empregues na fase inicial do SRS como indicadores do impacto e magnitude da situação, sendo o cortisol a hormona preferentemente quantificada (Iki, Ahrens, Pasche, Bartels & Erhard, 2011; Nibblett *et al.*, 2011). Ainda que pendente de averiguação, a experiência clínica suporta que a semivida biológica desta molécula no gato seja similar à da humana, isto é, cerca de 66 minutos (Lowe, 2016).

O processo de escolha dos marcadores de *stress* mais adequados depende sempre das características da experiência e dos recursos disponíveis, já que nenhum é exclusivo do SRS (Kim & Diamond, 2002). Devido à variabilidade nos resultados de cada, será apropriado optar-se por mais que um indicador, de modo a aumentar a precisão (Dougall & Baum, 2012). Para o presente projecto, optou-se pelo estudo do comportamento, da concentração de cortisol e da frequência respiratória.

## COMPORTAMENTO

Apesar da comunicação interespecies não ser inata, os humanos têm a habilidade de aprender e compreender o comportamento felino (Beaver, 2003). A capacidade de interpretar sinais e implicações da postura corporal é essencial na profissão do Médico Veterinário, muito embora nem todos os clínicos a possuam (Overall, 2013).

O motivador mais comum de variações comportamentais no gato é, provavelmente, o *stress*, que desencadeia a conduta agonística, comumente dividida em ataque ofensivo e defesa, esta com as variantes fuga e inibição (Beaver, 2003). Estas alterações são facilitadas por controlos neurológicos, distinguindo-se elevada importância à neuroetologia, que interliga os principais processos neuronais e o comportamento consequente dos animais (Fraser, 2012).

## NEUROETOLOGIA

Os estímulos adquiridos do ambiente podem ser traduzidos em movimentos coordenados, associados a influxos neurológicos. A generalidade dos comportamentos diários dos gatos é involuntária, integrando a classificação de 'reflexos complexos', pois a sua formação é largamente independente da consciência da atividade. Por exemplo, alguns dos elementos agonísticos, como a ereção do pelo, bufar, mobilidade da cauda, protusão das garras e dilatação da pupila, são reflexivos (Bradshaw *et al.*, 2012). A manutenção de um ciclo contínuo, que possibilita a homeostasia, é da responsabilidade do SNC (Fraser, 2012).

Tal como referido anteriormente, a informação sensorial é processada no córtex cerebral e, caso seja reconhecida como discrepante, ocorre uma resposta emocional com a componente comportamental (Dantzer, 2016). As estruturas envolvidas na gestão de reações deste tipo localizam-se, predominantemente, no sistema límbico, pelo que este é responsável por comandar operações básicas/primitivas de sobrevivência, além de estabelecer características individuais de motivação, emoção e temperamento (Fraser, 2012).

Os constituintes do complexo límbico estão estritamente relacionados, desempenhando integralmente a sua função. Deste modo, enquanto a amígdala intervém na ação do hipotálamo e modula a conduta agonística, a área septal previne a hiper-reatividade ao moderar o estímulo sensorial e excluir informações com origem na amígdala, bem como no hipotálamo. O tálamo, além da relevância na receção sensorial, regula o estado de consciência psicológica e influencia o hipotálamo. Estando, igualmente, conectado com este último por meio do fórnix, o hipocampo tem implicações amplas em vários contextos, nomeadamente na emoção, em mecanismos de atenção, na personalidade, em memórias recentes e na atitude submissa (Beaver, 2003; Fraser, 2012).

Complementarmente às ligações descritas, diversas frações do prosencéfalo transmitem também, por intermédio do sistema límbico, mensagens neuronais ao hipotálamo. Portanto, esta estrutura é considerada a principal via eferente do complexo, organizando várias

respostas autonómicas (Fraser, 2012). Adicionalmente, determinadas porções do hipotálamo controlam elementos fortemente emocionais, incluindo medo, irritação, ira e agressão (Beaver, 2003). Neste caso, após ocorrência de um evento adverso, o lobo temporal inibe a porção média, cuja função é bloquear o comportamento de luta ou fuga, permitindo o aumento da atividade do sistema límbico (Fraser, 2012).

Por sua vez, a área cortical frontal participa na coordenação dos sinais provenientes do complexo límbico, que, posteriormente, serão integrados com os resultantes do funcionamento do neocórtex (Fraser, 2012).

Parte abundante dos influxos globais converge na formação reticular, situada no tronco cerebral, encarregue de processar e expedir informação pelas fibras reticulo-espinhais, que comunicam com neurónios intermédios na medula óssea ou diretamente com neurónios motores. Esta estrutura atua também no mecanismo que delibera o estado de alerta do SNC e produz o estado de excitação geral (Bradshaw *et al.*, 2012; Fraser, 2012).

## INDICADORES DE *STRESS*

Na generalidade, os felídeos domésticos não se refutam ao contato humano, pelo que condutas de evasão e refúgio com intenção de aumentar a distância ao estímulo podem indicar sentimentos adversos (Stella & Buffington, 2016). Quando a resposta de fuga não é eficaz ou possível, como acontece na hospitalização num CAMV, outras podem-na suceder, como a postura ofensiva ou, a mais comum, de bloqueio (Ley, 2016). Os gatos tendem a evitar confrontos diretos, expressando agressividade habitualmente como mecanismo de proteção contra o medo (Beaver, 2003; Rodan & Cannon, 2016).

Os comportamentos indicativos de *stress* centram-se nos defensivos, manifestados vocal e visualmente. Nos felinos, o método preferencial de comunicação é a variação corporal, sendo a vocalização apenas utilizada para transmitir mensagens gerais (Beaver, 2003). Na realidade, a emissão vocal é invulgar entre gatos, quase limitada a encontros indesejados com rivais ou qualquer situação extremamente frustrante (Brown & Bradshaw, 2014; Landsberg, Hunthausen & Ackerman, 2013).

Os sons emitidos em *stress* são expressos em estados emocionais intensos, podendo ser produzidos com a boca inicialmente aberta e gradualmente a fechar ('protesto', bastante usual na contenção física) ou somente com a boca aberta ('rosnar' e 'bufar'), normalmente com observação de caninos e a zona da comissura labial tensa. Caracterizando estes últimos, o 'rosnar' ocorre durante uma exalação voluntariamente lenta, constante e de baixa frequência, informativa de interação colérica; enquanto o 'bufar' e a variante mais extrema '*spit*' são reações de defesa inconscientes (autonómicas), resultantes da passagem súbita e forçada do ar por uma pequena fresta (Beaver, 2003; Landsberg *et al.*, 2013).

Contrariamente, a expressão visual por sinais corporais é silenciosa, porém imensamente diversificada, sendo aconselhável caracterizar cada área separadamente, em orelhas,

pupilas, olhos, narinas, vibrissas, cauda, postura e atitude geral (Beaver, 2003; Landsberg *et al.*, 2013; Overall, 2013).

As orelhas dos gatos movem-se rápida e fluidamente. Quando estão eretas demonstram atenção e focalização (Figura 2, A1B0). À medida que a assertividade ou agressividade passiva aumenta as orelhas giram, a princípio lateralmente, exibindo o pavilhão auricular de lado (Figura 2, A2B0), e posteriormente latero-ventralmente (Figura 2, A1B2) ou apenas ventralmente (Figura 2, A2B2). Caso estejam totalmente caudais e ventrais, moldadas à cabeça de modo a que a aurícula externa não seja visível (Figura 2, A0B2), revelam comportamento de defesa extrema e, em último recurso, de ataque (Overall, 2013).

A alteração da dimensão e forma da pupila é extremamente informativa, pois a estimulação do SNS provoca midríase, ou seja, quanto mais *stressado* o animal, mais dilatadas e arredondadas as pupilas (Overall, 2013). Tanto *stressors* visuais como não visuais podem desencadear este mecanismo, desde que sejam súbitos (Bradshaw, Casey & Brown, 2012). É pertinente referir ainda que, a sua avaliação, terá de considerar as condições de iluminação do local (Overall, 2013).

Algumas condutas normais estão supressas nos animais internados, nomeadamente o repouso, sobrepondo-se a monitorização do ambiente e o estado de vigilância, com os olhos muito despertos (Carney *et al.*, 2012; Casey & Bradshaw, 2007; Rodan & Cannon, 2016).

Como consequência de qualquer ativação do SNS, as narinas do gato expandem, sendo acompanhadas por tensão nos músculos da mandíbula (Overall, 2013).

A posição das vibrissas é também importante na compreensão da atitude, em que bigodes abertos 'em leque' simbolizam curiosidade e próximos da cabeça correspondem à defesa de uma ameaça (Beaver, 2003).

Apesar da cauda dos felinos ser excepcionalmente móvel, tendo a ponta mobilidade própria, algumas das apresentações, particularmente em episódios de elevada intensidade, são ambíguas (Brown & Bradshaw, 2014; Overall, 2013). Não obstante, este apêndice pode ser encontrado junto às pernas em comportamentos de defesa e proteção (Figura 3, A0B2 e A0B3), tal como ocorre quando em forma côncava (Figura 3, A0B1); enquanto um deambular subtil e deliberado, especialmente da ponta, pode indicar agitação e perturbação (Beaver, 2003). A cauda eriçada, baixa (Figura 3, A2B2) ou ereta (Figura 3, A3B3), sugere reatividade, numa combinação de conduta ofensiva e defensiva, elucidada pela informação facial. Por fim, o movimento de chicotear a cauda rapidamente é associado a um estado ativo inicial, com irritação geral (Overall, 2013).

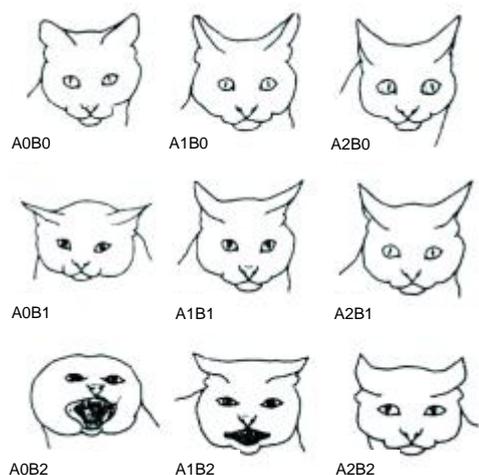
Existem múltiplas posturas corporais que sinalizam *stress* e, aquando da sua análise, dever-se-á apreciar em conjunto a posição de repouso e das pernas, bem como a silhueta do dorso. (Landsberg *et al.*, 2013). A acomodação esternal de modo agachado denota defesa (Figura 3, A0B2 e A0B3), várias vezes associada à cauda enroscada no corpo. Por sua vez, os membros posteriores retos e acompanhados da elevação do quarto traseiro (Figura 3,

A3B0) adverte para uma atitude bastante ofensiva (Overall, 2013). O clássico “gato de *Halloween*” (Fig. 3, A3B3), de apresentação lateral, dorso arqueado, membros em extensão e ereção do pelo, evidencia um elevado nível reacional, com misto de conduta ofensiva e defensiva (Beaver, 2003; Ley, 2016). Tipicamente, quando a cabeça se encontra recolhida entre a zona das escápulas, o animal não tenciona atacar (Brown & Bradshaw, 2014).

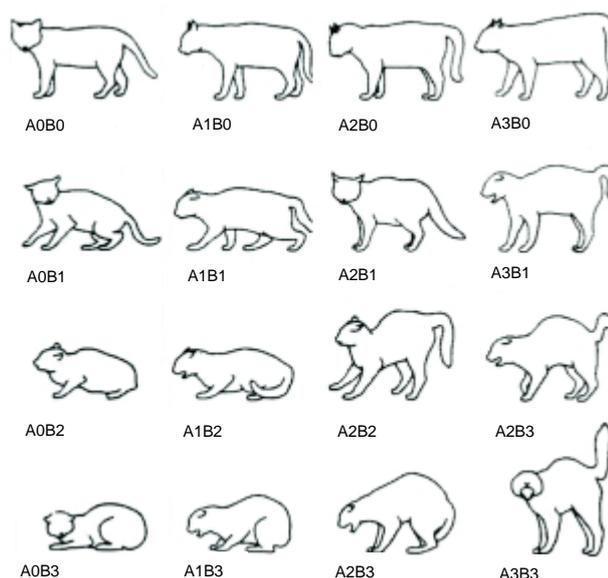
A atitude geral pode ser deduzida pelo aspeto global da jaula após algumas horas de confinamento: se não existir qualquer alteração pode-se assumir que o gato exibe inibição comportamental; em contraste, se estiver desarrumada depreende-se a tentativa de refúgio ou fuga. Independentemente significam sempre sensações negativas, como medo ou ansiedade (Stella & Buffington, 2016).

Resumidamente, as posturas corporais e a atitude indicam o estado emocional e a intenção do indivíduo, enquanto os marcadores faciais demonstram informação imediata e contextual (Ley, 2016; Overall, 2013). Assim, na mudança de conduta em resposta às flutuações ambientais são usuais as disposições ambivalentes, sendo irrevogável a necessidade de avaliar as expressões concomitantemente (Brown & Bradshaw, 2014). Quando ocorrem incongruências, a forma de comunicação que prevalece será a mais mutável, pois possibilita a perceção correta da mensagem transmitida (Ley, 2016).

**Figura 2** – Ilustração de expressões faciais do gato. Fonte: Overall et al., 2004



**Figura 3** – Ilustração de posturas corporais do gato. Fonte: Overall et al., 2004



### ETOGRAMA DE STRESS

A avaliação da magnitude de *stress* experienciado por um organismo através da observação de expressões faciais, postura corporal e atitude geral é desafiante, por isso, em estudos etológicos, é fundamental a construção de testes empíricos padronizados que permitem classificar estados subjetivos (Mellor, Patterson-Kane & Stafford, 2009; Stanton, Sullivan & Fazio, 2015). Assim, o etograma consiste numa lista de comportamentos específicos do

tema e espécie a analisar, associado à descrição e definição dos mesmos, proporcionando elevada objetividade e credibilidade (Ellis & Zulch, 2010; Stanton *et al.*, 2015).

Em virtude da individualidade felina e da extensa variedade de fontes de *stress*, existe uma vasta diversidade de meios de quantificação comportamental disponíveis na literatura. Porém, uma das escalas compostas, indicada para gatos confinados, destaca-se pela ampla aplicação, sendo derivada e refinada a cada investigação (Casey & Bradshaw, 2007). Originalmente denominada ‘*Cat-Assessment-Score*’, inicialmente com 10 categorias e com posterior redução para 7, foi concebida em 1992 por McCune. Em 1997, Kessler e Turner adaptaram o método e amplificaram-no, adicionando mais elementos posturais, para formar o ‘*Cat-Stress-Score*’ (CSS) (Anexo II), mantendo-se no entanto as 7 classes, que variam entre o “totalmente relaxado” até ao “aterrorizado” (Casey & Bradshaw, 2007; Overall, 2013). Composto por 11 aspetos do comportamento felino, o CSS integra elementos de postura, apresentação, vocalização e níveis de atividade. É, particularmente, empregue na apreciação de gatis e abrigos, efeitos do enriquecimento ambiental, qualidade de vida ou evolução do grau de *stress* (Rochlitz, 2014). As vantagens deste recurso incluem a elevada concordância entre observadores, descrições claras e capacidade de avaliar a coerência entre regiões distintas (Overall, 2013). Contudo, são apontadas incertezas relativamente à equivalência dos intervalos entre categorias, além da viabilidade de classes intermédias quando o animal exhibe sinais ambivalentes (Casey & Bradshaw, 2007). Ademais, no estudo de McCobb, Patronek, Marder, Dinnage e Stone (2005), o CSS não demonstrou ser útil na identificação de gatos com conduta equiparada a altos níveis de *stress* ou com inibição comportamental.

Assim, o desenvolvimento de um etograma, original ou baseado nos existentes, é uma técnica comum nos estudos etológicos (Robertson, 2016). Este deverá cumprir os seguintes atributos definidos: (1) ser fundamentado por alterações funcionais e visíveis, em resposta a determinado estímulo; (2) ter um objetivo humano estabelecido; (3) ser intuitivo e (4) ser empírico (Mellor *et al.*, 2009). Adicionalmente, a terminologia aplicada deve ser padronizada, por forma a permitir a comparação entre experiências, e precisa, evitando interpretações díspares (Stanton *et al.*, 2015). Este instrumento terá de ser testado, para certificar a sua legitimidade (diferentes graus de intensidade correspondem a classificações na escala coincidentes), repetibilidade (distintos observadores categorizam a mesma conduta de modo semelhante) e utilidade em situações clínicas. Idealmente, o etograma deverá ser simples, de fácil e rápida utilização, adequado para qualquer usuário e contido numa página ou menos (Robertson, 2016).

## CORTISOL

No que concerne aos glucocorticoides, a concentração de cortisol é o parâmetro métrico de *stress* mais frequentemente utilizado nos gatos em estudos de bem-estar, pois predomina a corticosterona em quantidade e atividade biológica (Galac, Reusch, Kooistra & Rijnberk, 2010; Johnstone *et al.*, 2013; Sheriff, Dantzer, Delehanty, Palme & Boonstra, 2011).

## CICLO BIOLÓGICO

A totalidade do cortisol num organismo é inteiramente derivada pela secreção do córtex da glândula adrenal, em particular da região fasciculada e reticular (Behrend, 2015; Galac *et al.*, 2010). O colesterol, precursor das hormonas esteroides, pode ser incorporado na síntese de cortisol por várias vias: aproximadamente 80% é obtido do plasma, por endocitose de partículas lipoproteicas de baixa densidade (LDL – do inglês *low-density lipoprotein*); parte é formada *de novo* na adrenocortical a partir do acetato; quando há necessidade de resposta rápida, ocorre hidrólise de ésteres armazenados em gotículas lipídicas citoplasmáticas das células adrenais (Behrend, 2015; Galac *et al.*, 2010; Vinson, Whitehouse & Hinson, 2007). As enzimas do citocromo P-450 pertencentes ao grupo das oxigenases são os agentes preponderantes na conversão da esteroidogénese (Galac *et al.*, 2010).

A hormona é secretada, imediatamente após biossíntese, na circulação sanguínea, já que as células do córtex não têm valência de armazenagem, sendo que sensivelmente 75% se liga com alta afinidade à transcortina (CBG – do inglês *corticosteroid-binding globulin*) e 12% com baixa afinidade à albumina e eritrócitos. A finalidade fisiológica destas proteínas centra-se, provavelmente, na capacidade de tamponamento, prevenindo oscilações céleres na concentração de cortisol. Apenas a porção livre, biologicamente ativa, é transportada para o citosol e acoplada ao recetor intracelular específico, originando o complexo funcional (Galac *et al.*, 2010).

Os recetores de glucocorticoides estão amplamente distribuídos nos tecidos orgânicos, encontrando-se descritos dois subtipos bioquimicamente distintos aos quais o cortisol se coapta com afinidade díspar, nomeadamente o recetor de glucocorticoides (RG) e o de mineralcorticoides (RM) (Fink, 2016; Vinson *et al.*, 2007). Devido à maior conexão com os RM, estes são primariamente ocupados em condições basais, durante o ciclo circadiano. Durante o episódio de *stress*, decorre saturação dos RM com um aumento sequente na ligação do cortisol aos RG (Prickaerts & Steckler, 2005).

O fígado e rim correspondem aos principais locais responsáveis pela metabolização corticosteróide, procedendo à inativação e aumento da solubilidade da hormona. No gato, a enzima quantitativamente mais significativa é a 11beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo II, que transforma o cortisol em cortisona na fase I, sucedendo-se a conjugação com sulfato ou, em menor escala, com ácido glucurónico. Contrariamente a outras espécies, nos felinos a excreção é predominantemente efetuada através da bÍlis, com 86% dos metabolitos

resultantes nas fezes e somente 14% na urina (Ellis, Protopapadaki, Stryhn, Spears & Cockram, 2014; Galac *et al.*, 2010). Adicionalmente, cerca de 1-2% do total de hormona circulante é eliminada na urina na sua forma inalterada (Galac *et al.*, 2010).

## EFEITOS FISIOLÓGICOS EM *STRESS*

Sabe-se que os glucocorticoides são essenciais na conservação da homeostasia metabólica e especialmente benéficas em condições de *stress* transitório, regulando mecanismos de defesa por duas vias opostas, porém complementares (Lowe, Campbell & Graves, 2008; Vinson *et al.*, 2007). No modo permissivo, estas hormonas preparam o organismo para a atividade comum e estão implicadas na manutenção basal do eixo HPA, estabelecendo o seu limiar de resposta a estímulos. Em contraste, as ações do modo supressivo, que emergem apenas em concentrações elevadas de cortisol, previnem reações exageradas, possibilitando a adaptação e recuperação da situação adversa por meio de efeitos anti-inflamatórios, hiperglicémicos e psicológicos, bem como por depressão de sistemas e mecanismos não fundamentais (Buckingham, 2010; Vinson *et al.*, 2007).

Os glucocorticoides limitam a resposta do sistema imunológico, acionado principalmente pelas catecolaminas libertas no decorrer do SRS, ao atuarem na imunidade celular inata e adquirida, tendo menor interferência a nível humoral (Lewe *et al.*, 2008; McEwen, 2007). A alteração do tráfego de leucócitos constitui um dos métodos primários de mediação do cortisol, com libertação de neutrófilos da medula óssea, associada à diminuição da marginalização e diapedese destes, e redistribuição de linfócitos para compartimentos extravasculares, sendo os linfócitos T os mais afetados, particularmente os CD4+. Esta modificação reflete-se no típico 'leucograma de *stress*', que, para além de não ser frequentemente observado nos gatos, tem como característica basilar a falta de consistência (Feldman, 2015; Lewe *et al.*, 2008). Não obstante, a inibição da migração dos neutrófilos para os locais de inflamação é uma das ações anti-inflamatórias principais dos glucocorticoides, prejudicando também a acumulação de macrófagos nos tecidos, possivelmente devido à redução na produção de fatores quimiotáticos (Lewe *et al.*, 2008).

O cortisol influi profundamente no metabolismo da glucose, contribuindo na gliconeogénese e no controlo da libertação periférica de substrato, de modo a suplementar energia para a movimentação sequente à resposta 'luta ou fuga' (Casey & Bradshaw, 2007; Galac *et al.*, 2010). Os glucocorticoides aumentam a formação hepática de glucose, essencialmente, por regularem positivamente uma enzima limitante do processo (a fosfoenolpiruvato carboxiquinase), estimulando ainda a síntese de glicogénio. Adicionalmente, o cortisol promove insulino-resistência, antagoniza os efeitos desta no fígado e pode inibir a secreção das células  $\beta$  pancreáticas. A nível dos tecidos periféricos, primordialmente no músculo-esquelético, o transporte dependente de insulina do recetor de glucose para a membrana

celular é inibido, resultando numa menor absorção e metabolização de glúcidos (Lewe *et al.*, 2008). Em associação, os glucocorticoides suscitam a libertação de aminoácidos e ácidos gordos livres na circulação, utilizados posteriormente como percursores na gliconeogénese (Galac *et al.*, 2010).

Os corticosteroides atravessam livremente a barreira hematoencefálica, exercendo intervenções complexas em mecanismos cognitivos, por meio de recetores específicos que diferem na localização dentro do cérebro (Vinson *et al.*, 2007). Os RM são expressos principalmente no hipocampo, podendo ser igualmente encontrados em menor quantidade noutras estruturas límbicas. Em comparação, os RG apresentam-se dispersos pela maioria das regiões cerebrais, embora sejam particularmente densos no hipocampo e amígdala, além de substanciais no NPV (Prickaerts & Steckler, 2005). Os RM estão implicados no processamento e integração dos estímulos ambientais, bem como na manutenção do influxo de informações e no despoletar do SRS; enquanto os RG estão envolvidos nas modificações comportamentais decorrentes da resposta ao *stress*, consolidação da memória e potencialização da aprendizagem (Fink, 2016; Joëls & Baram, 2009). É o hipocampo, aliado integralmente a outras estruturas, que medeia as consequências da ativação de ambos recetores (Prickaerts & Steckler, 2005).

Os glucocorticoides têm atuação bifásica, ou seja, os benefícios iniciais de concentrações adequadas à exposição a um evento *stressante* são ultrapassados em caso de níveis elevados ou prolongados de cortisol, com a estimulação exagerada dos RG a provocar graves efeitos deletérios (Fink, 2016; Prickaerts & Steckler, 2005).

## MEDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORTISOL

Atualmente existem várias opções de matrizes das quais se pode recolher amostras para quantificar o cortisol, incluindo fezes, urina, saliva e sangue periférico, bem como a partir do pelo, sendo este um método recente, indicado especialmente em estudos que requerem monitorizações longas, pois não revela flutuações diárias devido ao seu crescimento lento (Accorsi *et al.*, 2008; Johnstone *et al.*, 2013; Novak *et al.*, 2013).

Nos felinos, a concentração de cortisol e, conseqüentemente, dos seus metabolitos nas fezes é proporcional à resposta adrenocortical, não sendo necessário a manipulação do animal para a colheita do material (Accorsi *et al.*, 2008; Ellis *et al.*, 2014). A mensuração obtida representa a acumulação de hormona durante cerca de um dia, podendo variar com o padrão de excreção individual (Bennett & Hayssen, 2010; Ellis *et al.*, 2014). Contudo, tanto a complexidade de metabolismo, reabsorção intestinal e ações da microflora, como a distribuição não uniforme e degradação na amostra congelada, contribuem para a dificuldade de interpretação (Johnstone *et al.*, 2013).

Em virtude de irregularidades nos valores de produção e efeitos de concentração da urina, a quantificação de cortisol deverá ser executada em conjunto com a da creatinina, visto ser um metabolito muscular eliminado por filtração glomerular a uma taxa constante (Novak *et al.*, 2013). Nesta matriz, a proporção de hormona reflete a resposta adaptativa ao *stress* das 4 a 8 horas anteriores, podendo divergir, especialmente em casos de inibição urinária devido a ambientes não familiares (Casey & Bradshaw, 2007).

Tanto o cortisol fecal como o urinário evidenciam a atividade adrenocortical durante um período extenso, servindo propósitos diferentes das amostras de sangue e saliva, já que a sensibilidade em detetar oscilações breves é limitada (Bennett & Hayssen, 2010; Novak *et al.*, 2013). Em contraste, as medições no sangue ou saliva denotam a concentração da hormona no instante, sendo esta o resultado da associação entre ciclos endógenos (cicardiano e sazonal), experiências imediatamente anteriores e acontecimentos a longo prazo (Sheriff *et al.*, 2011).

Apesar da necessidade de contenção leve a moderada, a recolha de saliva pode demorar até 4 minutos sem que ocorra alteração consequente na concentração de cortisol (Bennett & Hayssen, 2010; Galac *et al.*, 2010). Nesta espécie, a desvantagem primordial desta técnica é a dificuldade na obtenção de amostra com volume suficiente (Casey & Bradshaw, 2007). O emprego de estimulantes para induzir a salivação, como o ácido cítrico, não é bem tolerado pelos felinos e pode incrementar, artificialmente, os níveis de cortisol (Bennett & Hayssen, 2010; Dreschel & Granger, 2009).

A matriz de primeira escolha de muitos estudos é o sangue periférico, pois é a que melhor indica a atividade do eixo HPA e determina reações dos animais a ameaças contingentes (Dreschel & Granger, 2009; Novak *et al.*, 2013; Sheriff *et al.*, 2011). Contudo, a própria contenção e manipulação imprescindível para a colheita da amostra pode provocar alterações no nível de cortisol em poucos minutos (Accorsi *et al.*, 2008). Esta situação é contornada pela aplicação de um cateter venoso e preparação prévia de todo o material, permitindo que o procedimento decorra com extrema rapidez (Novak *et al.*, 2013). Desta matriz obtém-se soro ou plasma, sendo o resultado da análise de ambas similar. No caso particular do plasma, o sangue deverá ser mantido em refrigeração e a centrifugação processada num tempo inferior a 24 horas, de modo a minimizar a degradação esteroide. A conservação das unidades a 20 °C negativos possibilita a estabilidade durante décadas (Sheriff *et al.*, 2011).

Os métodos correntes de análise da concentração de cortisol baseiam-se em imunoensaios, sendo os ELISA (do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*) os mais frequentes (Sheriff *et al.*, 2011). Estes subdividem-se consoante o género de reação enzimática que originam, com destaque para o mais clássico 'cromogéneo', cujo produto adsorve luz na gama do visível, e a variante 'quimiluminescente', em que ocorre libertação de fotões por ação química (Sino Biological Inc., 2004-2016). Os ELISA podem ser realizados em laboratório

técnico especializado ou a partir de sistemas comerciais completos, que exigem somente o leitor de placas. Não obstante, uma grande fração destes não foi ainda testada para uso em matriz animal, havendo a necessidade de validação preliminar (Sheriff *et al.*, 2011).

Concluindo, apesar da popularidade e utilidade da concentração de cortisol como marcador de *stress*, a interpretação dos valores deve ser cautelosa, apreciando-se sempre os dados representativos do grupo em detrimento dos singulares e ponderando-se o modo de secreção pulsátil da hormona, bem como a influência de fatores como idade, sexo e fase do ciclo reprodutivo (Casey & Bradshaw, 2007; Iki *et al.*, 2011).

## **FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA**

Quando o SRS é despoletado ocorrem também alterações no modo e padrão de ventilação, aliado ao aumento da frequência respiratória (Reece, 2015; Schleifer, Ley & Spalding, 2002).

## **REGULAÇÃO NEUROLÓGICA DA VENTILAÇÃO**

A respiração é um mecanismo essencialmente involuntário, gerado por descargas rítmicas dos neurónios motores dependentes de impulsos cerebrais. Existem dois mecanismos distintos que a regulam, nomeadamente: (1) o sistema responsável pelas ações voluntárias, localizado no córtex cerebral; (2) o de domínio automático, integrado no tronco encefálico e denominado 'Centro respiratório' (Reece, 2015; Barrett, Brooks, Boitano & Barman, 2010).

Deste centro, 4 regiões diferentes foram identificadas: o grupo respiratório dorsal (GRD) e o grupo respiratório ventral (GRV), respetivamente na área dorsal e ventral da medula oblonga; o centro pneumotáxico (CP) e o centro apneustico (CA), reciprocamente na fração rostral e caudal da ponte. O GRD origina a cadência básica do ciclo e está primariamente associado à atividade inspiratória, transmitindo a informação via nervo frénico ao diafragma; enquanto os neurónios do GRV atuam principalmente na expiração, ainda que possam participar na primeira fase, auxiliando no processo iniciado pelo GRD. Visto que a expiração, em circunstâncias normais, progride de forma passiva, habitualmente a porção do GRV correspondente não se encontra ativa. Por sua vez, o CP limita a inspiração, regulando a duração desta e assim o volume inspiratório. Complementarmente, o CA provavelmente influencia a profundidade da inspiração, não existindo, porém, consenso quanto ao seu encargo (Reece, 2015).

Apesar da ligação experimental e cientificamente aceite, existe escassez de investigação relativa à interação entre o SRS e o sistema respiratório, particularmente a nível da intersecção de controlos neuronais. Os poucos estudos disponíveis sugerem que os circuitos cerebrais envolvidos na translação da informação percebida possam, similarmente, intervir nos padrões de respiração, com destaque do tronco cerebral e complexo límbico, bem como do hipotálamo (Abelson, Khan & Giardino, 2010). Efetivamente, descargas provenientes do NPV aumentam a atividade respiratória, além da ação isolada da hormona CRF, que atua como estimulante da ventilação (Behan & Kinkead, 2011; Abelson, Khan & Giardino, 2010). Assim, ainda que outras áreas possam estar envolvidas, é progressivamente evidente a relevância da interação do hipotálamo com estruturas límbicas, que culmina em interferência no fluxo nervoso do centro respiratório (Abelson *et al.*, 2010; Barrett *et al.*, 2010).

## COMO MARCADOR DE *STRESS*

A frequência respiratória, mensurada por observação direta dos movimentos abdominais ou torácicos durante o tempo equivalente a um minuto, não é considerada uma medida específica de *stress*, visto que pode estar elevada em outras situações, incluindo doença, dor ou em exercício (Casey & Bradshaw, 2007; Overall, 2013). Contudo, considerando animais sãos, sob analgésicos e confinados, este parâmetro apresenta grande utilidade, particularmente na diferenciação entre o animal que está em repouso (respiração pausada) do que apenas demonstra bloqueio comportamental (com aumento da frequência) (Casey & Bradshaw, 2007; Stella & Buffington, 2016).

## FATORES MODELADORES DO SRS

O controlo adequado da alostase é essencial para a manutenção da saúde do organismo, visto que, tanto o excesso como a insuficiência de resposta, podem originar estados patológicos (Herman, McKlveen, Solomon, Carvalho-Netto & Myers, 2012; Raison & Miller, 2003). Este controlo caracteriza-se por ser um processo complexo, em que múltiplas vias convergem numa rede abrangente, capaz de coordenar a ativação e intensidade do sistema através de recetores e neurocircuitos (Herman *et al.*, 2012; Myers, McKlveen & Herman, 2012; Ulrich-La & Herman, 2009).

## SISTEMA DE RETROALIMENTAÇÃO NEGATIVA

A inibição do eixo HPA é mediada pelo seu principal produto e, apesar de atuar em diversos locais, distingue-se a sinalização a nível dos neurónios do NPV hipotalâmico e células do lobo anterior da hipófise, primariamente por meio de RG (Galac *et al.*, 2010; Raison & Miller, 2003; Ulrich-La & Herman, 2009).

O facto de lesões no NPV possibilitarem o bloqueio da retroalimentação negativa permite aferir que esta é a região central deste mecanismo, ao suprimir os influxos sinápticos excitatórios, resultando na redução inicial da taxa de libertação de AVP e, posteriormente, de CRF (Fink, 2012; Myers *et al.*, 2012).

Na glândula hipofisária, os glucocorticoides prejudicam a capacidade de reação ao CRF, diminuindo profundamente a secreção de ACTH. O cortisol coíbe ainda a expressão do precursor da ACTH, impossibilitando a síntese desta hormona. Adicionalmente, a ACTH está implicada no circuito que regula a sua própria produção (Behrend, 2015; Fink, 2012).

## INIBIÇÃO NEUROLÓGICA

A atividade do SRS é, igualmente, controlada por componentes cerebrais, sendo o sistema límbico implicado na modulação de *stress* psicogénico eliciado por eventos do meio externo. Neste caso, a moderação do eixo HPA e SNA, concebida ponderando o estado fisiológico, é viabilizada mediante a conexão deste complexo aos neurónios do hipotálamo (Myers *et al.*, 2012; Ulrich-La & Herman, 2009).

Considerando que a estimulação do hipocampo inibe a secreção de glucocorticoides e que os seus efeitos são mais pronunciados na fase de recuperação, conclui-se que este estará envolvido no término da ativação do eixo HPA. De forma semelhante, a fração medial do córtex pré-frontal participa no termo da resposta adrenal, regulando a duração da secreção. Complementarmente, o hipocampo influencia o tónus autonómico, sendo esta função possivelmente executada através do córtex pré-frontal (Ulrich-La & Herman, 2009).

O facto de várias estruturas límbicas apresentarem RG sugere que, a regulação do SRS, por estas áreas, seja mediada pela retroalimentação dos glucocorticoides (Herman *et al.*, 2012; Myers *et al.*, 2012).

## CONSEQUÊNCIAS DO *STRESS*

Nos felinos, o SRS é um mecanismo evolutivo e extremamente adaptado, demonstrando eficiência em situações desconhecidas ou que transmitam ameaça, sendo esta real ou somente potencial (Casey & Bradshaw, 2007; Kim & Diamond, 2002; Nesse, Bhatnagar & Ellis, 2016). Este aumenta a capacidade de defesa através de alterações controladas que preparam o animal para atividade imediata e otimizam a vigilância, além de reunir recursos para uma possível lesão, sem negligenciar a proteção contra reações internas exageradas (Casey & Bradshaw, 2007; Nesse *et al.*, 2016). Contudo, a ocorrência constante de falsos alarmes num ambiente que o animal não controla pode originar sobrecarga alostática no organismo (Dougall & Baum, 2011).

## EFEITOS DELETÉRIOS

Os eventos externos adversos podem suscitar o desenvolvimento de várias afeções físicas, além de incitar emoções negativas, que aumentam a probabilidade de problemas do foro psicológico (Karagiannis, 2016).

Níveis elevados de *stress*, como os experienciados na hospitalização num CAMV, estão associados a alterações na atuação do sistema imunitário, promovendo o surgimento de doenças infecciosas (Bradshaw, 2012; Dougall & Baum, 2011). Destas, as mais frequentes no gato são as infeções do sistema respiratório superior, devido à inibição da produção de imunoglobulinas A ou à reativação de agentes infecciosos latentes no organismo, como o vírus da rinite felina (Karagiannis, 2016; Tanaka, Wagner, Kass & Hurley, 2012). Está também reportada a conexão entre *stress* e o aumento da sensibilidade à peritonite infecciosa felina, a progressão de neoplasias por perturbação na função de supressão tumoral ou o risco acrescido de desenvolvimento de cistite idiopática felina (CIF), a causa mais comum de doença do trato urinário inferior nesta espécie (Buffington, 2011; Dougall & Baum, 2011; Karagiannis, 2016; Rodan, 2016).

Adicionalmente, estão descritas inibições do comportamento natural da espécie, incluindo a alimentação, cuidados de higiene, excreção, exploração e brincadeira; ou perturbações deste, nomeadamente eliminação fora da caixa e conduta obsessiva-compulsiva, como por exemplo, hiperatividade e limpeza excessiva (Karagiannis, 2016; Tanaka *et al.*, 2012).

O hipocampo caracteriza-se por ser a região mais sensível e moldável do SNC, sendo a função fisiológica, metabolismo neuronal, sobrevivência e propriedades intrínsecas das células prejudicadas pelo *stress* (Kim & Diamond, 2002; McEwen, 2007). Situações condicionadas por emoções negativas criam recordações contextuais intensas e de longa duração, que posteriormente despoletam reações temerosas similares, podendo igualmente incrementar a reatividade geral a estímulos (Karagiannis, 2016; Kim & Diamond, 2002).

## PERÍODO PÓS-OPERATÓRIO

O efeito do *stress* na capacidade de recuperação e reabilitação do corpo é, particularmente, relevante no período pós-cirúrgico, pois os animais que se encontram a recuperar da anestesia estão, inequivocamente, mais reativos e sensíveis a estímulos (Dougall & Baum, 2011; Gouin & Kiecolt-Glaser, 2011).

O SRS pode interferir no processo de cicatrização em várias etapas ao diminuir a expressão local de citocinas pró-inflamatórias, inibir a produção de metaloproteinases da matriz ou promover o decréscimo na produção de péptidos antimicrobianos pela epiderme e infiltração de leucócitos no local, aumentando a suscetibilidade da incisão a infeções (Gouin & Kiecolt-Glaser, 2011).

Os diversos mecanismos de cicatrização estão interligados e alterações nos eventos iniciais comprometem grandemente as fases seguintes. A regeneração indigente aumenta o risco de complicações, amplifica o desconforto do doente e adia o retorno à rotina diária (Gouin & Kiecolt-Glaser, 2011).

## **AMBIENTE DO CAMV**

Complementarmente aos efeitos na saúde, a magnitude do *stress* ambiental experienciado num CAMV modifica amplamente a conduta do gato, comprometendo cuidados médicos básicos ao dificultar a deteção de alterações subtis, impossibilitar observações específicas e detalhadas ou exames complementares, inibir o profissional em efetuar procedimentos que possam amplificar a aversão à experiência e, por fim, complicar o tratamento, já que os animais continuam a exibir comportamento hostil após o regresso a casa (Cannon & Rodan, 2016; Lloyd, 2014). Ademais, o SRS influencia parâmetros laboratoriais e físicos, que podem ser erroneamente considerados patológicos, sujeitando o animal a planos medicamentosos prescindíveis (Rodan & Cannon, 2016).

A opção de se moldar os fatores ambientais à espécie alvo, com o objetivo de minimizar condutas inadequadas e incrementar a diversidade comportamental, permite que o animal tenha maior capacidade de integração e adaptação ao novo espaço. Assim, além de se reduzir o impacto do *stress* no doente, promovendo a recuperação célere e conveniente do organismo, favorece-se também a produtividade e eficiência dos serviços (Rodan & Cannon, 2016; Rodan *et al.*, 2011; Stella & Buffington, 2016). Adicionalmente, o CAMV beneficia com o aumento da segurança e satisfação no trabalho, bem como a relação com os proprietários, elevando a probabilidade de retorno e recomendação (Overall *et al.*, 2004; Rodan & Cannon, 2016).

Desta forma, quando a hospitalização é inevitável, será de extrema relevância providenciar condições que respeitem a natureza felina, possibilitando ao gato deter a sensação de controlo e familiaridade, de modo a reduzir sinais agonísticos (Rodan, 2016; Rodan & Cannon, 2016).

## **CONDIÇÕES NO INTERNAMENTO**

Independentemente do tempo de permanência no internamento do CAMV, é essencial proporcionar um ambiente previsível, com ínfimas perturbações impróprias (Rodan & Cannon, 2016; Stella *et al.*, 2014). O reconhecimento de potenciais fontes de *stress* ambiental viabiliza a adoção de medidas elementares, porém efetivas, que potenciam vantagens a longo prazo (Cannon & Rodan, 2016).

Relativamente ao agrupamento de espécies na enfermaria, será preferível reservar um espaço somente para gatos e prevenir a visualização de outros felinos desconhecidos, devido às características territoriais do seu temperamento, posicionando as jaulas de modo transversal ou simetricamente, costas com costas (Rudd, Demetriou & Langley-Hobbs, 2014). Os animais que exibem elevada ansiedade, agressividade aliada a medo ou que vocalizem excessivamente devem ser isolados, por forma a restringir a exposição a estímulos (Rodan & Cannon, 2016). Adicionalmente, a área de hospitalização deverá ser

distanciada das restantes zonas do CAMV, impedindo a movimentação aleatória e minimizando o confronto com pessoas (Rodan & Cannon, 2016; Rudd *et al.*, 2014).

É recomendada a presença de luz natural ou artificial a, pelo menos, um metro de separação da jaula, com redução dos níveis de luminosidade, propiciando o repouso (Carney *et al.*, 2012). A intensidade sonora deverá ser inferior a 60 dB, equivalente ao grau de conversação serena, reprimindo ruídos inesperados de alta amplitude, como o som de abertura abrupta da porta da jaula (Rudd *et al.*, 2014; (Stella & Buffington, 2016)). Ademais, deve-se tentar evitar odores potencialmente aversivos, refinando o ambiente com aromas naturais tolerados (ervas, cheiro a presa), ou feromonas felinas sintéticas. Por fim, a neutralidade térmica para gatos é entre os 30 e 38 °C, embora a prevalência nos CAMV se centre nos 18 a 26 °C. Assim, a temperatura intermédia ideal de 26,7 °C pode ser obtida com recurso a cobertores ou sistemas de aquecimento, considerando ainda que determinados pacientes (doentes, geriátricos, sedados ou pediátricos) necessitam de um ambiente mais quente (Carney *et al.*, 2012; Stella & Buffington, 2016).

A consistência de todos os fatores é profundamente importante, nomeadamente o horário de procedimentos médicos, de limpeza ou alimentação, permitindo a familiarização com a rotina do internamento (Rodan & Cannon, 2016). Complementarmente, a relevância da qualidade de interação com os humanos sobrepõe-se à da quantidade desta, visto que os felinos se adaptam com maior facilidade a novos meios se comunicarem com pessoas conhecidas diariamente. Desta forma, é preferível um número reduzido de profissionais destacados para cada caso, proporcionando a formação e manutenção de previsibilidade na relação estabelecida, bem como favorecendo a deteção de ténues modificações na conduta habitual, indicativas de alterações na saúde ou bem-estar (Stella & Buffington, 2016).

A formação da equipa médico-veterinária e a preparação do CAMV para as particularidades da espécie felina são aspetos fundamentais na prevenção de eventos adversos, diminuindo os efeitos deletérios do *stress* no organismo, além de promoverem o aperfeiçoamento dos cuidados médicos e o sucesso dos serviços prestados (Rodan *et al.*, 2011).



### PARTE III – AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO STRESS

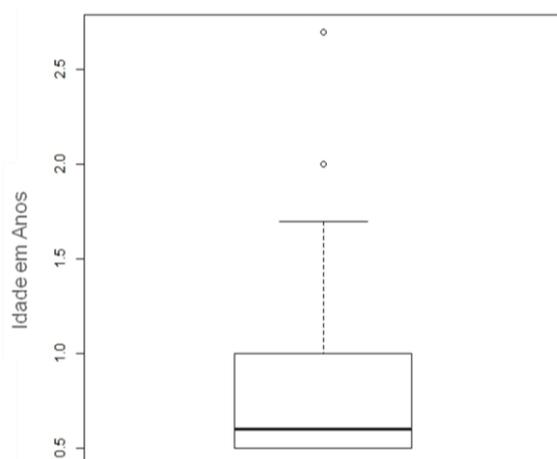
O presente estudo foi efetuado nas instalações do HEV-FMV e reflete o interesse pessoal da autora pela espécie felina e área cirúrgica. Considerando que a fase crítica do período peri-operatório não finda com o término da cirurgia, procurou-se comprovar os benefícios de algumas das condições do macroambiente recomendadas na literatura para gatos hospitalizados, através da análise de parâmetros fisiológicos e comportamentais, já que, na extensão de pesquisa da autora, até à data de publicação desta dissertação nunca existiu investigação científica sobre as vantagens destas na redução do *stress* experimentado pela espécie.

## MATERIAIS E MÉTODOS

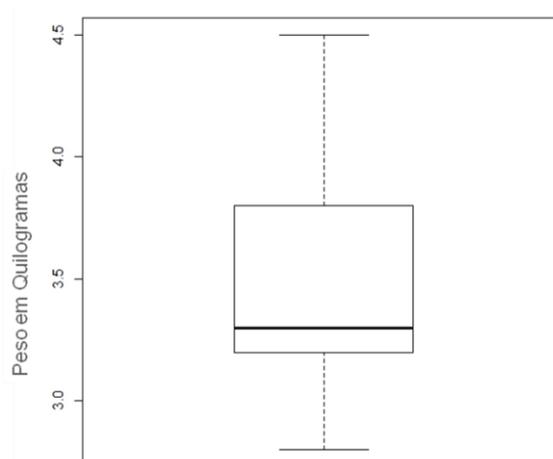
### AMOSTRA EM ESTUDO

A amostra em estudo foi constituída por 33 (N= 33) fêmeas da espécie *Felis silvestris catus*, clinicamente em estado hígido e submetidas a OVH, previamente programada pelo proprietário. Os constituintes do grupo não tinham raça especificada, exceto dois animais (1 persa e 1 *British shorthair*), apresentando idade compreendida entre os 6 meses e os 2,7 anos (média  $\pm$  erro padrão da média (SEM):  $0,9 \pm 0,1$  anos) e peso mínimo de 2,8 kg e máximo de 4,5 kg (média  $\pm$  SEM:  $3,5 \pm 0,08$  kg), sendo a distribuição das características expressa nos Gráficos 2 e 3. Todos os indivíduos que apresentaram desvios nas análises pré-cirúrgicas, idade superior a 3 anos ou com alterações congénitas anatómicas foram, automaticamente, excluídos do estudo.

**Gráfico 2** – Distribuição em *boxplot* dos dados da idade da amostra em estudo



**Gráfico 3** – Distribuição em *boxplot* dos dados do peso da amostra em estudo



## TERAPÊUTICA E TÉCNICA CIRURGICA

Após avaliação inicial, não seletiva, do temperamento geral de cada animal integrado no estudo, os indivíduos foram encaminhados para a área de preparação cirúrgica do hospital, onde aguardavam o procedimento dentro da própria transportadora encoberta, de modo a anular o estímulo visual.

A medicação pré-anestésica incluiu amoxicilina associada a ácido clavulânico (10 mg/kg; SC), meloxicam (0,2 mg/kg; SC) e buprenorfina (0,02 mg/kg; IM). Para indução anestésica utilizou-se quetamina (5-7,5 mg/kg; IM) em combinação com dexmedetomidina (40 µg/kg; IM), sendo a manutenção da anestesia efetuada com isoflurano. O cateter venoso foi colocado num dos membros anteriores e realizou-se fluidoterapia com NaCl a 0,9%, a uma taxa fixa, calculada pela fórmula 3 x peso vivo. A tricotomia e a assepsia compreenderam a área cranial ao apêndice xifoide, caudal à púbis e entre os mamilos.

Na cirurgia, a primeira incisão foi feita no terço médio da distância entre a cicatriz umbilical e a púbis, abrangendo a pele e tecido subcutâneo. Em seguida, a linha alba abdominal foi tendida com a pinça e incisionada, sendo a abertura prolongada no sentido caudal e cranial ao longo da linha média com a tesoura. Após localização do útero, um dos cornos foi seguido cranialmente, por forma a situar o ovário. O ligamento suspensor do ovário foi estirado entre o polegar e o indicador. Colocou-se uma pinça hemostática entre o corno uterino e o ovário, enquanto o ligamento suspensor do ovário foi pinçado o mais cranialmente possível e cortado para exteriorização do ovário e do pedículo. Seguidamente, foram efetuadas duas ligaduras simples em redor da artéria e veia ovárica. Depois de se seccionar o pedículo ovárico proximal às ligaduras, a porção do ovário foi exteriorizada, verificando-se a inexistência de hemorragia no pedículo libertado. Fez-se a disseção romba dos ligamentos redondo e largo, permitindo a exteriorização do corno uterino, e o procedimento foi repetido no lado contralateral. Seguidamente, foram posicionadas duas pinças hemostáticas ao nível do cérvix, sendo realizadas duas ligaduras de transfixação a envolver o corpo uterino. O útero foi transectado entre as pinças e liberto, confirmando-se a ausência de hemorragia. A linha alba abdominal foi encerrada com sutura contínua simples e a aproximação do tecido subcutâneo efetuada com recurso a pontos em forma de cruz ou sutura contínua simples, enquanto a pele foi encerrada com sutura intradérmica (Langley-Hobbs, 2014; adaptado).

O sistema de fluidoterapia foi retirado no final da cirurgia, sendo acoplado um mandril correspondente no cateter e colocado um colar isabelino de tamanho apropriado ao animal. A reversão do efeito da dexmedetomidina foi realizada no local de internamento, com recurso a atipamezol (0,1 mg/kg; IM).

## ACOMODAÇÕES

Após a cirurgia, os felinos em estudo foram distribuídos aleatoriamente em duas frações, nomeadamente o grupo de controlo (GC) e grupo de estudo (GE). No GC (N=9), estes foram alojados individualmente numa jaula de aço inoxidável com dimensões de 71 cm x 71 cm x 71 cm, numa sala isolada de outros animais com temperatura média  $\pm$  SEm de  $20,5 \pm 0,43$  °C, luz artificial fluorescente de 58 watts a 6 metros de altura, intensidade sonora média  $\pm$  SEm de  $49,0 \pm 2,44$  dB e odor primariamente a lixívia, aparentemente tolerado pela espécie (Morgan & Tromborg, 2007). Relativamente ao GE (N=24), os indivíduos foram acomodados de modo singular numa jaula de aço inoxidável com medições de 55 cm x 55 cm x 71 cm, no internamento do hospital com temperatura média  $\pm$  SEm de  $21,5 \pm 0,43$  °C, luz natural com exposição indireta, odor a antissépticos e outros animais da espécie felina e canina. Em função da intensidade sonora ambiental, não controlada pela autora, o GE foi subdividido em 3 categorias: 'Calmo', quando inferior a 60 dB ( $56,6 \pm 1,99$  dB); 'Médio', entre 60 e 85 dB ( $78,9 \pm 1,27$  dB); 'Ruidoso', quando superior a 85 dB ( $97,4 \pm 1,61$  dB). Em ambos os grupos, os animais foram colocados na jaula com 2 cobertores, um a cobrir toda a superfície e outro dobrado em redor do corpo, e os profissionais não efetuaram qualquer procedimento médico, de limpeza ou alimentação durante o período experimental.

## DESCRIÇÃO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para ambos os grupos (GC e GE), o estudo contemplou a colheita de dados comportamentais e fisiológicos, nomeadamente a frequência respiratória e a concentração plasmática de cortisol, durante um período pós-operatório total de 3 horas. Apenas os animais que obtiveram o consentimento informado de participação do proprietário ingressaram no projeto.

Os dados referentes à conduta do animal foram obtidos com o uso do etograma desenvolvido para o presente estudo (Tabela 1). Este evoluiu do CSS de Kessler e Turner (1997), sendo apenas considerados os comportamentos expressos pela espécie em hospitalização e complementados alguns parâmetros. Adicionalmente, a organização foi fracionada em categorias principais, especificamente em Atividade, Corpo, Olhos, Pupila, Vibrissas, Orelhas e Cauda; por forma a permitir assinalar reações incongruentes. O valor de *stress* final, obtido pela soma de cada apresentação observada, foi designado Total.

Considerando que o etograma utilizado se baseou no CSS, certificado relativamente à legitimidade e utilidade em situações clínicas, foi somente necessário analisar a repetibilidade, de modo a validá-lo. Assim, um total de 6 observadores analisou em T2 o comportamento de uma gata independente do estudo submetida ao mesmo protocolo terapêutico e cirúrgico.

**Tabela 1** - Etograma desenvolvido para o estudo

			Observações (Stanton, Sullivan & Fazio, 2015)
Atividade	A dormir ou repousar; sem tensão corporal	0	Dormir – gato em decúbito; movimento mínimo da cabeça e membros
	Alerta ou a investigar; tensão corporal mínima	1	
	Sinais subtis de constrangimento; menos responsivo a estímulos; tensão corporal ligeira	2	
	Imóvel e/ou isolado; pouco responsivo a estímulos; tensão corporal moderada	3	
	Ameaça quando se aproximam; tensão corporal elevada	4	
Corpo	Decúbito lateral	0	Investigar – gato demonstra atenção a um estímulo específico
	Decúbito esternal ou sentado	1	
	Em estação		
	com o dorso horizontal	2	
	com a parte anterior mais elevada que a posterior	2,5	
	Agachado	3	
	Dorso arqueado	4	
Olhos	Semicerrados	0	Ameaçar – agressividade induzida por medo; o gato direciona comportamentos agressivos, porém sem qualquer contacto físico
	Desperto	1	
	Amplamente abertos	2	
Pupila	Não dilatada	0	Decúbito – o corpo do gato está sobre a superfície numa posição horizontal
	Dilatada	1	
Vibrissas	Descontraídas (laterais)	0	Sentar – o gato está em posição vertical, com os membros traseiros fletidos e descansados na superfície, enquanto os anteriores estão em extensão e retos
	Para a frente e/ou em leque	1	
	Para trás (perto do focinho)	2	
Orelhas	Descontraídas (parcialmente de lado)	0	Estação – o gato está levantado e imóvel, com os quatro membros em extensão apoiados na superfície, suportando o corpo
	Eretas	1	
	Parcialmente achatadas	2	
	Achatadas	3	
Cauda	Estendida ou descontraída	0	Agachado – o gato posiciona o corpo perto da superfície, pelo que os quatro membros estão fletidos
	Tensa		
	com ondulação da ponta	1	
	perto do corpo	1,5	
	Tipo “chicote”	2	
Eriçada	3	Dorso arqueado – o gato curva a coluna dorsalmente e mantém-se rígido	
			Orelhas eretas – apontadas para cima; verticais
			Orelhas achatadas – próximas da cabeça; tendem a estar niveladas com o topo desta
			Ondulação da ponta – a cauda movimenta-se lenta e gentilmente de lado para lado

As informações comportamentais foram obtidas após um período de permanência de 5 minutos em frente à jaula de internamento, tentando minorar a influência da presença do observador. O registo destas foi efetuado em 3 tempos, respetivamente 1 hora (T1), 2 horas (T2) e 3 horas (T3) após o término da cirurgia.

A frequência respiratória, obtida pela contagem do número de movimentos do tórax e/ou abdómen no período equivalente a 1 minuto, foi avaliada igualmente em T1, T2 e T3.

Ponderando que o sistema comercial ELISA usado para quantificar a concentração plasmática de cortisol se encontra apenas aprovado para humanos, foi necessário validá-lo para a espécie felina. Assim, foram colhidas em duplicado amostras de sangue venoso de 6 gatos em estado hígido e não pertencentes ao estudo, sendo metade da matriz colocada em tubo seco e a outra parte em tubo EDTA. O plasma obtido foi analisado pelo sistema comercial ELISA da DRG<sup>®</sup> EIA-1887, enquanto o soro prosseguiu para o Laboratório de Endocrinologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária, utilizando-se o método de ELISA quimiluminescente, validado para pequenos animais.

Para a quantificação da concentração plasmática de cortisol no estudo, efetuou-se a colheita de sangue venoso periférico imediatamente a seguir à finalização da sutura de pele (T0), enquanto o doente ainda se encontrava sob anestesia, e em T3, ambos através do cateter previamente colocado, tendo o cuidado de desperdiçar as primeiras gotas. O sangue foi colocado em tubo de EDTA e armazenado em refrigeração entre 0 a 4 °C até às primeiras 24 horas, sendo posteriormente centrifugado a 5000 rotações durante 10 minutos. O plasma obtido foi transferido para um tubo de *ependorf* e conservado a 20 °C negativos. Após finalização de recolha das amostras, a concentração de cortisol plasmático foi analisada utilizando o sistema EIA-1887, cuja leitura foi realizada no leitor de placas ELISA do Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina Veterinária.

#### *Protocolo utilizado na análise com o sistema comercial ELISA da DRG<sup>®</sup> EIA-1887*

Devido à quantidade numérica de amostras, foram usados dois sistemas EIA-1887. Em ambos, primariamente procedeu-se à organização dos produtos necessários, como a colocação dos reagentes nas manjedouras, planeamento da disposição das amostras e controlos na placa de ELISA e preparação da solução de lavagem de acordo com as indicações. Cada poço, com plasma amostral ou solução padrão, foi efetuado em duplicado. Posteriormente, seguiram-se as recomendações de utilização descritas no manual da DRG<sup>®</sup>, sendo estas constituídas pelos passos seguintes:

1. Distribuir 20 µL de solução padrão ou plasma amostral nos poços apropriados;
2. Dispor 200 µL do conjugado enzimático em todos os poços;
3. Misturar minuciosamente por 10 segundos;
4. Incubar durante 60 minutos à temperatura ambiente sem cobrir a placa;
5. Desprezar o conteúdo da placa;

6. Enxaguar os poços com 400  $\mu$ L da solução de lavagem e dispensar; repetir este passo três vezes; virar a placa em papel absorvente de modo a remover gotas residuais;
7. Adicionar 100  $\mu$ L de solução substrato a cada poço;
8. Incubar por 15 minutos à temperatura ambiente;
9. Juntar 100  $\mu$ L da solução de paragem em todos os poços, por forma a findar a reação enzimática.

Por fim, a absorvância da placa ELISA foi mensurada, na densidade ótica de  $450\pm 10$  nm, pelo leitor de placas de microtitulação SpectraMax<sup>®</sup> 340PC384 da Molecular Devices, após 2 e 10 minutos da adição da solução de paragem, sendo os valores finais obtidos pela média das duas medições. A conversão para concentração de cortisol foi efetuada a partir da curva padrão, através do programa SoftMax<sup>®</sup> Pro, versão 5.1 (Anexo III).

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos valores obtidos foi avaliada utilizando o teste Shapiro-Wilk. Na validação do etograma, relativamente à repetibilidade, foi aplicado o coeficiente de correlação intraclasse (ICC – do inglês *intraclass correlation coefficient*). Para a aprovação do sistema EIA-1887 da DRG<sup>®</sup> recorreu-se à análise de concordância entre métodos de Bland-Altman, em associação com o teste t para amostras emparelhadas. Os resultados do etograma, apresentados como 'Total' do GC e das subdivisões do GE (Calmo, Médio e Ruidoso), foram comparados nos 3 tempos com o teste Kruskal-Wallis aliado ao procedimento *post-hoc* de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF), sendo os dados da frequência respiratória analisados pelos mesmos métodos. Os valores da concentração plasmática de cortisol foram comparados entre GC e GE, em T0 e T3, utilizando o teste de Wilcoxon Rank Sum para amostras independentes. A congruência entre os marcadores de *stress* usados, isto é Etograma (Etog), Frequência Respiratória (FR) e Concentração Plasmática de Cortisol ([Cort]<sub>p</sub>), foi avaliada através do coeficiente de correlação de Spearman, usando a totalidade de dados das variáveis em T3.

O teste Shapiro-Wilk, teste t para amostras emparelhadas, teste Kruskal-Wallis e teste Wilcoxon Rank Sum foram interpretados considerando um nível de significância de 5% ( $\alpha=0,05$ ) e um intervalo de confiança de 95%. Relativamente ao ICC, valores de correlação  $<0,4$  equivalem a níveis de significância clínica fraca, entre  $0,4 - 0,59$  razoável, entre  $0,6 - 0,74$  forte e  $>0,75$  excelente (Cicchetti, 1994). A análise estatística foi realizada no programa de R<sup>®</sup>, versão 3.3.1, em associação com as extensões Rcmdr (*R commander*), NSM3 (*Nonparametric Statistical Methods, Third Edition*), BlandAltmanLeh (*Bland-Altman Plot*) e ICC (*Intraclass Correlation Coefficient*).

*Breve caracterização de alguns métodos estatísticos utilizados*

O ICC é uma medida estatística descritiva que pode ser empregue quando dados quantitativos se encontram organizados em classes, indicando a força de associação entre unidades pertencentes à mesma categoria (expressa entre 0,0 – 1,0) e aferindo a variância entre observações de indivíduos distintos (Indrayan, 2013).

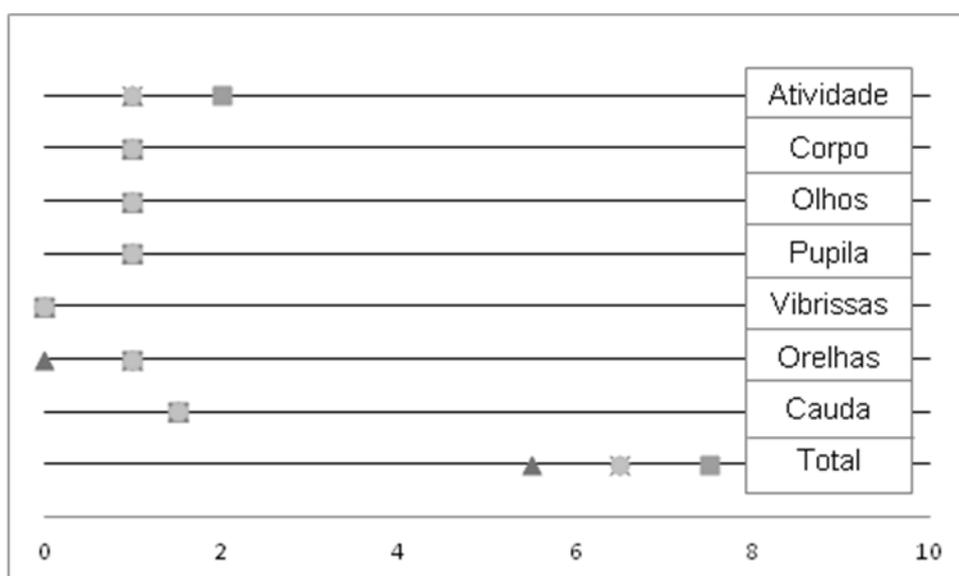
A análise de concordância de Bland-Altman facilita a comparação de duas ferramentas de medição por meio de um gráfico. Neste, em que no eixo do x se encontra a média entre os valores das duas técnicas  $\{(A+B)/2\}$  e no eixo do y a diferença entre as mesmas  $\{A-B\}$ , é evidenciado o viés, ou seja, a média das diferenças. Quando a quantificação coincide, o viés iguala zero ou tem resultado semelhante. Adicionalmente, este gráfico permite conhecer o alcance da divergência entre os dois métodos, através dos limites de concordância, que definem a área onde 95% das diferenças estimadas estarão incluídas (Indrayan, 2013).

O DSCF é um procedimento não paramétrico *post-hoc* que possibilita localizar diferenças após o teste de comparação múltipla. Assim, o contraste é considerado estatisticamente significativo quando o valor absoluto de DSCF for superior ao *cut-off* vinculado (Juneau, 2007).

## RESULTADOS

Os valores assinalados pelos observadores para a validação da repetibilidade do etograma são apresentados no Gráfico 4. A média  $\pm$  SEM registada para cada categoria foi de  $1,17 \pm 0,17$  na Atividade;  $1,0 \pm 0,0$  no Corpo;  $1,0 \pm 0,0$  nos Olhos;  $1,0 \pm 0,0$  na Pupila;  $0,0 \pm 0,0$  nas Vibrissas;  $0,83 \pm 0,17$  nas Orelhas;  $1,5 \pm 0,0$  na Cauda e  $6,5 \pm 0,26$  no Total (Tabela 2). Considerando estes dados, obteve-se um ICC de 0,98, indicando um nível de significância clínica excelente, com limites do intervalo de 95% de confiança [0,95; 1] e variância média dentro das classes de 0,09 (Tabela 2).

**Gráfico 4** – Valores registados pelos observadores nas diferentes categorias do etograma e soma das apresentações (Total)



**Tabela 2** - Características amostrais dos valores registados pelos observadores e resultado da aplicação do coeficiente de correlação intraclassa (ICC)

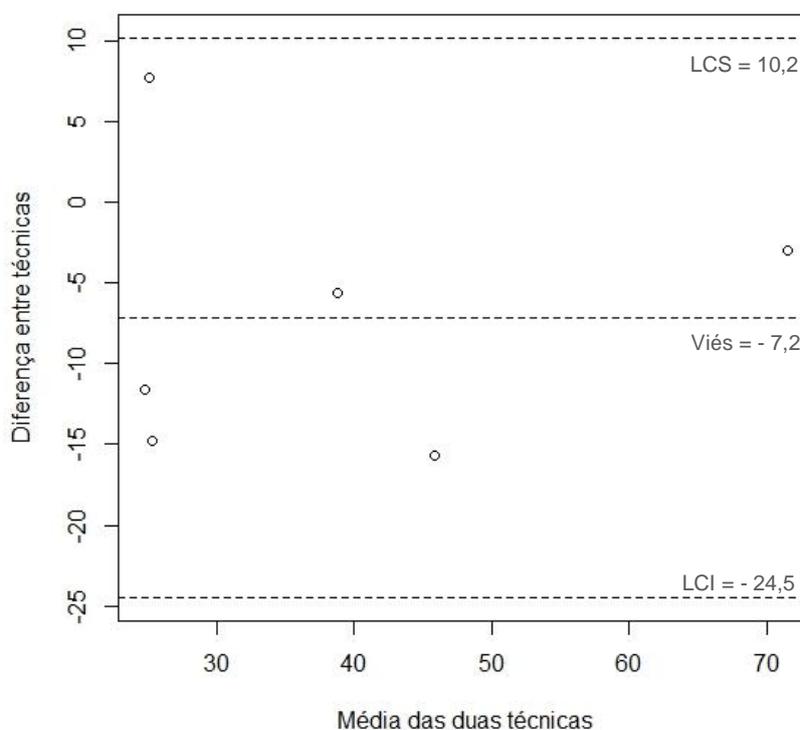
	N	Média $\pm$ SEM	ICC	Intervalo de 95% confiança	Variância média
Atividade	6	1,17 $\pm$ 0,17	0,98	0,95 – 1,0	0,09
Corpo		1,0 $\pm$ 0,0			
Olhos		1,0 $\pm$ 0,0			
Pupila		1,0 $\pm$ 0,0			
Vibrissas		0,0 $\pm$ 0,0			
Orelhas		0,83 $\pm$ 0,17			
Cauda		1,5 $\pm$ 0,0			
Total		6,5 $\pm$ 0,26			

Os valores da concentração de cortisol obtidos com ambas as técnicas apresentaram uma distribuição normal ( $P > 0,05$ ), nomeadamente  $P = 0,68$  para o sistema ELISA EIA-1887 e  $P = 0,17$  para a ELISA quimiluminescente laboratorial, sendo a média  $\pm$  SEM de cada  $45,15 \pm 7,78$  ng/ml e  $35,0 \pm 7,63$  ng/ml, respetivamente (Tabela 3). O Bland-Altman *plot* (Gráfico 5) evidenciou um viés de  $-7,2$  entre as técnicas que, após a aplicação do teste t para amostras emparelhadas, não demonstrou ser estatisticamente significativo ( $P > 0,05$ ), pois  $P = 0,1$ . Contudo, os limites de concordância foram amplos: entre  $-24,5$  e  $10,2$ .

**Tabela 3** – Características amostrais e resultado do teste Shapiro-Wilk em ambas as técnicas

	N	Média $\pm$ SEM	Shapiro-Wilk
Kit EIA- 1887	6	$45,15 \pm 7,78$	$P = 0,68$
ELISA laboratorial		$35,0 \pm 7,63$	$P = 0,17$

**Gráfico 5** – Bland-Altman *plot* dos resultados obtidos com a técnica ELISA quimiluminescente laboratorial (A) e o sistema ELISA EIA-1887 (B)



**Legenda:** LCS – limite de concordância superior; LCI – limite de concordância inferior

A caracterização da amostra para o GC e o GE quanto ao Etog, a FR e a  $[Cort]_p$  nos tempos considerados encontra-se detalhada nas Tabelas 4 e 5. Os valores do teste de Shapiro-Wilk, a análise estatística utilizada na comparação entre divisões e o resultado sequente estão apresentados na Tabela 6. Através da análise dos valores obtidos pelo teste Shapiro-Wilk é possível afirmar que o pressuposto da normalidade é rejeitado para todas as variáveis nos tempos distintos ( $P < 0,05$ ), exceto na FR de T1 ( $P = 0,058$ ).

**Tabela 4** - Características amostrais do Etog e da FR em ambos os grupos nos diferentes tempos

	Grupo/ Subdivisão	N	Etog		FR	
			Mediana	IQR	Mediana	IQR
T1	GC	9	3,0	1,0 (3,0 – 2,0)	22,0	5,0 (25,0 – 20,0)
	GE/ Calmo	8	3,5	1,38 (4,38 – 3,0)	33,5	10,25 (37,75 – 27,5)
	GE/ Médio	10	9,5	1,13 (10,25 – 9,13)	35	13 (39,5 – 26,5)
	GE/ Ruidoso	6	12,5	0,38 (12,88 – 12,5)	43,0	7,5 (47,5 – 40,0)
T2	GC	9	2,0	0,0 (2,0 – 2,0)	20,0	3,0 (21,0 – 18,0)
	GE/ Calmo	7	3,0	1,25 (3,75 – 2,5)	28,0	14,5 (33,0 – 18,5)
	GE/ Médio	10	8,5	1,38 (9,88 – 8,5)	41,0	10,0 (47,0 – 37,0)
	GE/ Ruidoso	7	13,5	1,75 (13,75 – 12)	45	8,5 (47,5 – 39,0)
T3	GC	9	1,0	1,0 (2,0 – 1,0)	20,0	2,0 (18,0 – 20,0)
	GE/ Calmo	9	3,0	1,0 (3,0 -2,0)	30,0	9,0 (32,0 – 23,0)
	GE/ Médio	9	9,5	1,5 (9,5 – 8)	35,0	12,0 (40,0 – 28,0)
	GE/ Ruidoso	6	13,0	2,5 (14,25 – 11,75)	57,0	7,5 (60,0 – 52,5)

Legenda: IQR – intervalo interquartil

**Tabela 5** - Características amostrais da  $[Cort]_p$  em ambos os grupos nos diferentes tempos

	Grupo/Subdivisão	$[Cort]_p$		
		N	Mediana	IQR
T0	GC	9	18,63	16,81 (23,29 – 6,48)
	GE	24	33,78	30,44 (51,27 – 20,83)
T3	GC	9	37,41	28,16 (57,54 – 29,39)
	GE	24	42,31	51,98 (77,87 – 25,89)

Legenda: IQR – intervalo interquartil

**Tabela 6** – Valores do teste de Shapiro-Wilk; Indicação da análise estatística utilizada na comparação entre divisões e resultado sequente

	Variável	Shapiro-Wilk	Teste estatístico	Valor de $P$
T0	[Cort] <sub>p</sub>	$P= 2,6 \times 10^{-4}$	Wilcoxon Rank Sum	$P= 0,10$ *
T1	Etog	$P= 2,7 \times 10^{-3}$	Kruskal-Wallis	$P= 4,6 \times 10^{-6}$
	FR	$P= 0,058$ *		$P= 4,21 \times 10^{-4}$
T2	Etog	$P= 2,05 \times 10^{-3}$	Kruskal-Wallis	$P= 2,93 \times 10^{-6}$
	FR	$P= 0,024$		$P= 2,15 \times 10^{-4}$
T3	Etog	$P= 2,3 \times 10^{-3}$	Kruskal-Wallis	$P= 4,5 \times 10^{-6}$
	FR	$P= 4,7 \times 10^{-3}$		$P= 7,45 \times 10^{-5}$
	[Cort] <sub>p</sub>	$P= 5,5 \times 10^{-5}$	Wilcoxon Rank Sum	$P= 0,54$ *

Legenda: \* – resultados com  $P > 0,05$

Na Tabela 6 verificam-se diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) entre o GC e as subdivisões do GE nos valores do Etog, para T1 ( $P= 4,6 \times 10^{-6}$ ), T2 ( $P= 2,93 \times 10^{-6}$ ) e T3 ( $P= 4,5 \times 10^{-6}$ ), e da FR, em T1 ( $P= 4,21 \times 10^{-4}$ ), T2 ( $P= 2,15 \times 10^{-4}$ ) e T3 ( $P= 7,45 \times 10^{-5}$ ). Após avaliação com o *post-hoc* não paramétrico de DSCF, cujos resultados estão indicados na Tabela 7, averigua-se que existe diferença significativa ( $|D| > cut-off$ ) em todas as comparações efetuadas, exceto para a FR, entre as subdivisões Calmo e Médio em T1 ( $|D|= 0,63 < cut-off= 0,98$ ), bem como entre Médio e Ruidoso em T2 ( $|D|= 0,69 < cut-off= 0,97$ ).

Na análise da [Cort]<sub>p</sub> (Tabela 6) não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ( $P > 0,05$ ) entre o GC e o GE, tanto em T0, em que  $P= 0,1$ , como em T3, com  $P= 0,54$ .

**Tabela 7** – Resultados obtidos com a aplicação do *post-hoc* não paramétrico de DSCF

	Comparação	Etog		FR	
		D	Cut-off	D	Cut-off
T1	GC – Calmo	2,33	$> 0,37$	3,82	$> 0,02$
	GC – Médio	5,26	$> 0,0$	4,46	$> 0,0$
	GC – Ruidoso	4,57	$> 0,0$	4,51	$> 0,0$
	Calmo – Médio	5,07	$> 0,0$	0,63 *	$> 0,98$
	Calmo – Ruidoso	4,43	$> 0,0$	3,30	$> 0,08$
	Médio – Ruidoso	4,58	$> 0,0$	2,62	$> 0,26$

Legenda: \* – resultados em que  $|D| < cut-off$

**Tabela 7 (Continuação)** – Resultados obtidos com a aplicação do *post-hoc* não paramétrico de DSCF

	Comparação	Etog		FR	
		D	Cut-off	D	Cut-off
T2	GC – Calmo	3,06	> 0,12	1,73	> 0,64
	GC – Médio	5,29	> 0,0	4,63	> 0,0
	GC – Ruidoso	4,79	> 0,0	4,72	> 0,0
	Calmo – Médio	4,91	> 0,0	3,60	> 0,04
	Calmo – Ruidoso	4,46	> 0,0	3,98	> 0,01
	Médio – Ruidoso	4,77	> 0,0	0,69 *	> 0,97
T3	GC – Calmo	2,96	> 0,15	2,82	> 0,19
	GC – Médio	5,14	> 0,0	4,82	> 0,0
	GC – Ruidoso	4,59	> 0,0	4,52	> 0,0
	Calmo – Médio	5,12	> 0,0	2,82	> 0,20
	Calmo – Ruidoso	4,55	> 0,0	4,26	> 0,01
	Médio – Ruidoso	4,55	> 0,0	3,67	> 0,04

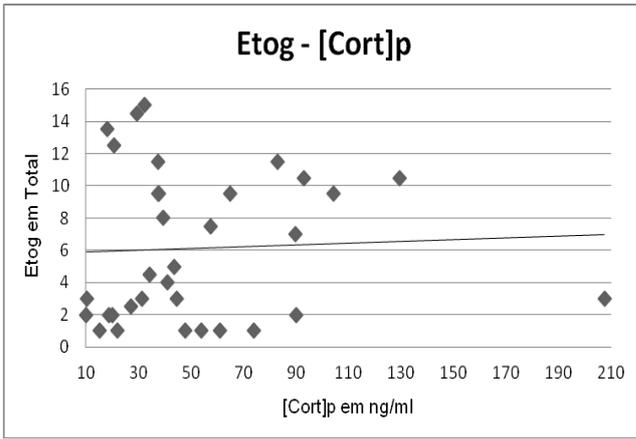
Legenda: \* – resultados em que  $|D| < cut-off$

Relativamente à correlação entre os marcadores de *stress* utilizados no estudo, foi possível verificar que a totalidade dos dados em T3 não apresentaram uma distribuição normal ( $P < 0,05$ ), sendo o resultado do teste de Shapiro-Wilk para o Etog de  $P = 2,23 \times 10^{-3}$ , FR de  $P = 4,7 \times 10^{-3}$  e  $[Cort]_p$  de  $P = 5,5 \times 10^{-5}$  (Tabela 8). A dispersão comparativa entre variáveis está representada nos Gráficos 6, 7 e 8. Na Tabela 9 estão apresentados os resultados da correlação de Spearman, que entre a  $[Cort]_p$  e o Etog foi de  $\rho = 0,09$  ( $P = 0,61$ ), enquanto com a FR de  $\rho = 0,20$  ( $P = 0,26$ ). Em oposição, o valor de correlação entre o Etog e a FR foi  $\rho = 0,91$  ( $P = 4,4 \times 10^{-13}$ ).

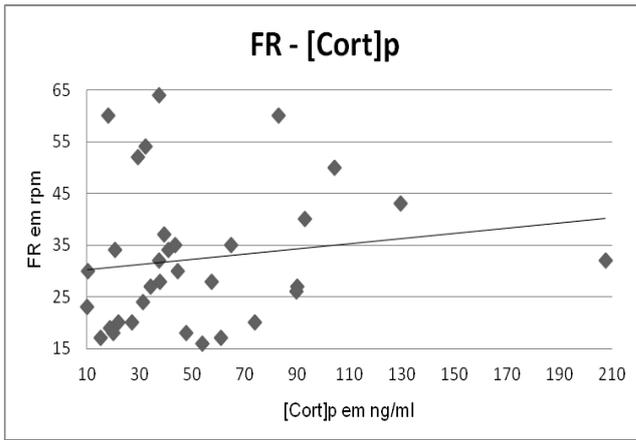
**Tabela 8** - Características amostrais e resultado do teste Shapiro-Wilk para totalidade de dados das variáveis em T3

	Variável	N	Mediana	IQR	Shapiro-Wilk
T3	Etog	33	4,5	7,5 (9,5 – 2,0)	$P = 2,3 \times 10^{-3}$
	FR		30,0	17,0 (37,0 – 20,0)	$P = 4,7 \times 10^{-3}$
	$[Cort]_p$		39,5	37,92 (65,08 – 27,16)	$P = 5,5 \times 10^{-5}$

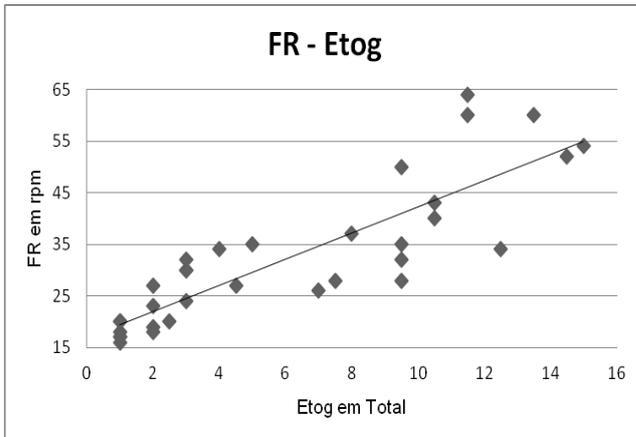
Legenda: IQR – intervalo interquartil



**Gráfico 6** - Dispersão comparativa entre os dados de Etog e [Cort]<sub>p</sub> em T3



**Gráfico 7** - Dispersão comparativa entre os dados de FR e [Cort]<sub>p</sub> em T3



**Gráfico 8** - Dispersão comparativa entre os dados de FR e Etog em T3

**Tabela 9** – Resultado do coeficiente de correlação de Spearman (Rho) entre os marcadores de *stress* utilizados

	$\rho$	Valor de $P$
<b>Etog – [Cort]<sub>p</sub></b>	0,09	$P= 0,61$ *
<b>FR – [Cort]<sub>p</sub></b>	0,20	$P= 0,26$ *
<b>FR – Etog</b>	0,91	$P= 4,4 \times 10^{-13}$

Legenda: \* – resultados com  $P > 0,05$

## DISCUSSÃO

Qualquer meio de classificação que dependa diretamente da observação humana terá sempre associado algum grau de subjetividade, ocorrendo, por isso, margem para erros (Robertson, 2016). No caso específico do etograma desenvolvido, a elevada correlação entre os registos dos diferentes avaliadores em cada categoria, aliada a limites de confiança estritos e baixa variância média, permitiu aferir a existência de uma excelente concordância entre indivíduos, sendo a repetibilidade da escala certificada. Ademais, conclui-se sobre a clareza de exposição, que limita a interpretação ambígua das descrições e, conseqüentemente, a subjetividade subjacente. Contudo, será sempre necessário considerar a individualidade do animal como fonte potencial de erro, devendo-se incluir um número apreciável de felinos na avaliação (Casey & Bradshaw, 2007).

O gráfico de Bland-Altman demonstrou um viés analiticamente diferente de zero, significando que, em média, a técnica do sistema EIA-1887 (B) mediu mais 7,2 ng/ml do que a do laboratório. Considerando um viés constante, explícito na ausência de correlação entre os eixos por homogeneidade na dispersão, seria possível ajustar as mensurações do sistema subtraindo-lhes 7,2 unidades (Indrayan, 2013). Todavia, esta diferença não se revelou estatisticamente significativa após aplicação do teste de comparação, depreendendo-se que o viés foi semelhante a zero. Não obstante, os limites de concordância apresentados são bastante divergentes, sendo praticamente inaceitável, em termos clínicos, conjecturar resultados que podem sobrestimar por 24,5 ng/ml o valor pressuposto. No entanto, esta discrepância poderá dever-se exclusivamente ao reduzido número de amostra utilizada, assumindo-se que os dois métodos são razoavelmente coincidentes com base no viés.

Apesar de o resultado do teste de Shapiro-Wilk indicar que os dados da FR em T1 apresentaram uma distribuição normal, foram executados testes não paramétricos a todos os grupos das variáveis, pois este tipo de análise estatística pode ser aplicada a todas as amostras sem restrição, desde que considerado o seu menor poder inferencial (Juneau, 2007).

A análise ao Etog possibilitou confirmar a inexistência de similitude entre as subdivisões do GE em todos os tempos, verificando-se o aumento da mediana concordante com o incremento da intensidade sonora. Visto que, neste grupo, não existiram outras modificações do macroambiente, é possível afirmar que o nível de pressão sonora é um dos fatores do meio que maior relevância tem na magnitude dos parâmetros do SRS em felinos hospitalizados. A mediana do GC foi significativamente mais baixa que qualquer subdivisão do GE, podendo esta ocorrência ser justificada pela reduzida intensidade sonora e/ou pela privação de odores agónicos, nomeadamente de outros animais da espécie canina e felina, bem como de antissépticos. Contudo, a interferência concreta de odores adversos não pôde ser depreendida do estudo efetuado. Adicionalmente, a discrepância do tipo de luz (artificial

para natural) e de cerca 1 °C na temperatura entre grupos não suplanta o benefício na amplitude do *stress* das restantes características do macroambiente anteriormente abordadas, pois apesar do GC ter as condições menos recomendadas, a mediana deste continuou a ser significativamente mais reduzida que a do GE.

Os dados da FR corroboraram o obtido com os do Etog, acrescentando a inconsistente semelhança entre determinadas subdivisões do GE. Em T1, o facto dos valores de Calmo e Médio não terem demonstrado diferença, indicando igual grau de *stress*, enquanto o Etog manifestou menor mediana para o Calmo, confirma a percepção da presença de bloqueio comportamental, em que o gato aparenta estar relaxado, porém, os seus parâmetros fisiológicos, especificamente a frequência respiratória, expõem o seu atual estado. Na verdade, a espécie felina em confinamento reage primariamente aos estímulos com conduta inibitória, e apenas posteriormente, com o aumento na intensidade da ameaça, modifica a postura corporal e outras características comportamentais (Stella & Buffington, 2016). A ocorrência equivalente entre Médio e Ruidoso em T2 poderá ter interpretação idêntica. Uma possível explicação para tal suceder em T1 num nível de intensidade sonora menor do que em T2 abrange a noção de controlo e previsibilidade, já que o animal se encontra mais vulnerável e sensível a estímulos num tempo inicial pela novidade de ambiente e ausência de familiaridade com o que o rodeia.

Relativamente à [Cort]<sub>p</sub>, a ausência de diferença estatística em T0 entre o GC e o GE evidencia que, a totalidade de animais incluídos no estudo, foi exposta a acontecimentos e estímulos de magnitude *stressante* idêntica no período prévio ao do protocolo experimental. Assim sendo, os achados clínicos das 3 horas posteriores, no pós-operatório, deveram-se somente à interferência do macroambiente da enfermaria, considerando que o microambiente foi semelhante em todos os casos. Similarmente, os valores em T3 não apresentaram diferença entre os grupos, indicando uma resposta hormonal não eficiente à variação de intensidade da agressão. Tal está em concordância com o estudo de Stella *et al.* (2013) em que não se verificou alteração dos níveis basais de cortisol após exposição ao *stressor*. Efetivamente, estão descritas na literatura científicas inconsistências na quantificação desta hormona, em que perturbações ambientais aparentam não induzir resposta mediada por cortisol (Schulte, 2014). Uma explicação plausível poderá ser o facto da ativação do eixo HPA refletir, sob condições propícias, episódios condicionados pelo medo, mas não ter a capacidade de repercutir consistentemente oscilações induzidas em ansiedade (Armario *et al.*, 2012). Todavia, será mais provável que, este resultado, fundamente a hipótese de que a concentração plasmática de cortisol atinge um *plateau* após ativação intensa, devido a saturação da síntese adrenocortical (Armario *et al.*, 2012). Na verdade, os felinos do presente estudo foram expostos a eventos adversos antes do período experimental, nomeadamente a privação de alimento, contenção na transportadora, deslocação até ao CAMV, tempo de espera, odores e sons na sala de preparação,

administração de fármacos, anestesia e técnica cirúrgica. Adicionalmente, o eixo HPA continuou a sofrer estimulação permanente no período pós-cirúrgico, pois, independentemente do grupo e subdivisão, o animal esteve exposto a um ambiente não familiar. Estes acontecimentos poderão ter reduzido os ésteres armazenados nas gotículas lipídicas citoplasmáticas, os precursores e/ou as enzimas necessárias à síntese adicional de glucocorticoides, mantendo-se o estado de *plateau* e impossibilitando a diferenciação consoante a intensidade do macroambiente.

O resultado da correlação de Spearman entre a  $[Cort]_p$  e o Etog demonstrou que não existe associação entre as variáveis, enquanto com a FR aferiu uma relação bastante fraca. Esta ocorrência pode ser justificada pelo referido anteriormente, em que se denota incongruência na variação dos valores do Etog e FR em comparação com os da  $[Cort]_p$  relativamente à magnitude de *stress*. Complementarmente, o estudo de McCobb *et al.* (2005) também não revelou correlação entre o sistema de classificação do comportamento CSS e o método de quantificação rácio cortisol-creatinina. Em oposição, o valor de correlação entre o Etog e a FR foi elevado, indicando uma conexão forte e positiva.

Durante o período de hospitalização verificou-se empiricamente que a maioria das gatas pertencentes ao GC se apresentou consideravelmente mais descontraída do que as do GE, interagindo com os humanos e exprimindo comportamento dócil. Ademais, a manipulação revelou-se notoriamente menos laboriosa, sendo muitas vezes apenas necessário uma pessoa para tirar sangue em T3 e remover, em seguida, o cateter venoso. Adicionalmente, a atitude dos profissionais era distinta entre grupos, sendo no GC praticada mínima contenção dos animais e despendido maior tempo na interação.

Não obstante da apresentação de direções pertinentes, no presente estudo é possível identificar algumas lacunas, cuja grandeza de significância é desconhecida, nomeadamente: (1) as jaulas utilizadas para o GC e GE, apesar do material igual e de conterem os mesmos objetos no seu interior, são de tamanho distinto; (2) a intensidade sonora registada foi a espontânea e, por isso, tem a vantagem de refletir o ambiente genuíno de enfermaria num CAMV, porém, não foi padronizada para todos os indivíduos hospitalizados; (3) não foi possível o uso de odores agradáveis à espécie, como feromonas artificiais, em ambos os grupos; (4) o período pós-operatório de 3 horas não permitiu apreciar a influência do ciclo luz:escuro.

## CONCLUSÃO

---

Os resultados do estudo permitiram aferir que a intensidade sonora é um dos fatores do macroambiente com elevada importância na amplitude da resposta ao *stress* na espécie felina. Contrariamente, o tipo de luz e diferença de cerca de 1 °C na temperatura ambiental não aparentou ter influência significativa no SRS da espécie, especialmente quando comparado com outros parâmetros avaliados. A interferência concreta de odores adversos não pôde ser depreendida do estudo efetuado, deduzindo-se apenas a sua relevância. Assim se conclui sobre a veracidade científica da maioria das recomendações existentes na literatura para o bem-estar dos gatos em hospitalização, em que será preferencial o isolamento da espécie, níveis de intensidade sonora reduzidos ao mínimo, sendo <60 dB um compromisso razoável, e a ausência de odores aversivos, tentando-se evitar o cheiro a outros animais e antissépticos.

Adicionalmente, a investigação possibilitou corroborar a hipótese que indica a frequência respiratória como um marcador excelente para evidenciar comportamentos de bloqueio nesta espécie. Além disto, realçou a interferência de acontecimentos *stressantes* no período prévio ao do protocolo experimental na variância da concentração plasmática de cortisol consequente a distintas intensidades do estímulo. Na prática, a avaliação exata da resposta glucocorticoide ao *stress* tem demonstrado ser desafiante (Stella *et al.*, 2013), sendo este estudo outro exemplo.

A perspetiva futura será realizar uma investigação que permita analisar os parâmetros do macroambiente separadamente, de modo a possibilitar a avaliação individual da influência destes no SRS e comparar os resultados, aferindo quais são os mais significativos. Os animais incluídos, além de em estado hígido, não deverão ser submetidos a eventos adversos antes do período em estudo, por forma a ser possível a consideração da concentração plasmática de cortisol.

Concluindo, o macroambiente é extremamente importante na espécie felina, especialmente quando em ambiente não familiar, controlável ou previsível, como a enfermaria do CAMV. Ademais, os animais evoluem constantemente na resposta dirigida ao estímulo, por isso, a experiência inicial num determinado meio precisará a reação atual e posterior (Rodan *et al.*, 2011). Desta forma, características ambientais que se adaptem às particularidades da espécie serão benéficas tanto para o animal, pois previnem efeitos deletérios derivados do *stress* e propiciam menor probabilidade de lesões pela contenção, como para o CAMV, já que melhoram a produtividade e eficiência dos serviços, a satisfação no trabalho e permitem contornar a principal oposição apontada pelos proprietários que é o impedimento de visitas mais regulares.



**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

Abelson, J. L., Khan, S. & Giardino, N. (April, 2010). HPA axis, respiration and the airways in stress - a review in search of intersections. *Biological psychology*, 84(1), pp. 57–65.

Accorsi, P. A., Carloni, E., Valsecchi, P., Viggiani, R., Gamberoni, M., Tamanini, C. & Seren, E. (January 15, 2008). Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *General and comparative endocrinology*, 155(2), pp. 398–402.

Armario, A., Daviu, N., Muñoz-Abellán, C., Rabasa, C., Fuentes, S., Belda, X., Gagliano, H. & Nadal, R. (2012). What can we know from pituitary-adrenal hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors?. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 32, pp. 749–758.

Barrett, K., Brooks, H., Boitano, S. & Barman, S. (2010). Section VII - respiratory physiology. In K. Barrett, H. Brooks, S. Boitano & S. Barman, *Ganong's review of medical physiology*. (23rd. ed.) (pp. 587-638). New York: The McGraw-Hill Companies, Inc.

Bayer HealthCare (January 21, 2013). *Bayer veterinary care usage study III: feline findings*. Obtido em Abril de 2016, de BayerDVM for US veterinary professionals: <http://www.bayerdvm.com/show.aspx/news-release-bvcus-iii-feline-findings>

Beaver, B. V. (2003). *Feline behavior: a guide for veterinarians*. (2nd ed.). United States of America: Saunders, Elsevier Science.

Behan, M. & Kinkead, R. (October, 2011). Neuronal control of breathing: sex and stress hormones. *Comprehensive physiology*, 1(4), pp. 2101-2139.

Behrend, E. N. (2015). Canine hyperadrenocorticism. In E. C. Feldman, R. W. Nelson, C. E. Reusch, J. C. R. Scott-Moncrieff & E. N. Behren, *Canine and feline endocrinology*. (4th ed.) (pp. 377-451). United States of America: Saunders, Elsevier Inc.

Bennett, A. & Hayssen, V. (October, 2010). Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domestic animal endocrinology*, 39(3), pp. 171–180.

Bernard, M. C. (1859). *Leçons sur les propriétés physiologiques et les altérations pathologiques des liquides de l'organisme*. Paris: J. B. Baillière et Fils.

Broom D. M. & Johnson, K. (2000). *Stress and Animal Welfare*. Boston: Kluwer Academic Publishers.

Brown, S. L. & Bradshaw, J. W. S. (2014). Communication in the domestic cat: within- and between-species. In D. C. Turner & P. Bateson, *The Domestic Cat: The Biology of its Behaviour*. (3rd ed.) (pp. 38-59). New York, United States of America: Cambridge University Press.

Buckingham, J. C. (2010). Glucocorticoids, role in stress. In G. Fink (Ed.), *Stress science: neuroendocrinology*. (pp. 381-388). Oxford, United Kingdom: Academic Press.

Buffington, C. A. T. (July/August, 2011). Idiopathic cystitis in domestic cats-beyond the lower urinary tract. *Journal of veterinary internal medicine*, 25(4), pp. 784–796.

Cairns, J. J. (2013). Stress, environmental. In S. Levin (Ed.), *Encyclopedia of biodiversity*. (2nd ed., Vol. 7) (pp. 39-44). Waltham: Academic Press.

Cannon, M. & Rodan, I. (2016). The cat in the veterinary practice. In I. Rodan, & S. Heath (Eds.), *Feline behavioral health and welfare*. (pp. 102-111). China: Elsevier Inc.

- Cannon, W. B. (July, 1929). Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews*, 9(3), pp. 399–431.
- Carney, H. C., Little, S., Brownlee-Tomasso, D., Harvey, A. M., Mattox, E., Robertson, S., Rucinsky, R. & Manley, D. S. (2012). AAFP and ISFM feline-friendly nursing care guidelines. *Journal of feline medicine and surgery*, 14, pp. 337–349.
- Casey, R. A. & Bradshaw, J. W. (2007). The assessment of welfare. In I. Rochlitz (Eds.), *The welfare of cats*. (Vol. 3) (pp. 23-46). The Netherlands: Springer.
- Cicchetti, D. (November, 1994). Guidelines, criteria, and rules of thumb for evaluating normed and standardized assessment instruments in psychology. *Psychological assessment*, 6(4), pp. 284–290.
- Dantzer, R. (2016). Behavior: overview. In G. Fink, *Stress: concepts, cognition, emotion and behavior - Handbook of stress: volume 1*. (pp. 57-64). United States of America: Academic Press.
- Dougall, A. L. & Baum, A. (2012). Stress, health and illness. In A. Baum, T. A. Revenson, & J. Singer (Eds.), *Handbook of health psychology*. (2nd ed.) (pp. 53-78). United States of America: Psychology Press.
- Dreschel, N. A. & Granger, D. A. (January, 2009). Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Hormones and behavior*, 55(1), pp. 163–168.
- Ellis, J. J., Protopapadaki, V., Stryhn, H., Spears, J. & Cockram, M. S. (2014). Behavioural and faecal glucocorticoid metabolite responses of single caging in six cats over 30 days. *Veterinary record open*, 1(1).
- Ellis, S. & Zulch, H. (2010). *Measuring behaviour*. Obtido em Maio de 2016, de Cat behaviour described - University of Lincoln: <http://www.learnaboutcats.co.uk/chapters/7-measuring-behaviour/a-How-to-measure-behaviour/3-developing-an-ethogram.html>
- FEDIAF. (2012). *Facts & figures 2012*. Obtido em Abril de 2016, de Facts and figures: statistics underline the importance of pet animals in society: <http://www.fediaf.org/facts-figures/>
- FEDIAF. (2014). *Facts & figures 2014*. Obtido em Abril de 2016, de Facts and figures: statistics underline the importance of pet animals in society: <http://www.fediaf.org/facts-figures/>
- Feldman, E. C. (2015). Hyperadrenocorticism in cats. In E. C. Feldman, R. W. Nelson, C. E. Reusch, J. C. R. Scott-Moncrieff & E. N. Behren, *Canine and feline endocrinology*. (4th ed.) (pp.452 -484). United States of America: Saunders, Elsevier Inc.
- Fink, G. (2010). Stress: definitions and history. In G. Fink (Ed.), *Stress science: neuroendocrinology*. (pp. 3-9). Oxford, United Kingdom: Academic Press.
- Fink, G. (2016). Stress, definitions, mechanisms and effects outlined: lessons from anxiety. In G. Fink, *Stress: concepts, cognition, emotion and behavior - Handbook of stress: volume 1*. (pp. 3-11). United States of America: Academic Press.
- Fraser, A. F. (2012). *Feline Behaviour and Welfare*. Malta: CABI International.
- Galac, S., Reusch, C. E., Kooistra, H. S. & Rijnberk, A. (2010). Adrenals. In A. Rijnberk & H. S. Kooistra (Eds.) *Clinical endocrinology of dogs and cats*. (2nd ed.) (pp. 93-154). Germany: Schlütersche
- Goldstein, D. S. & Kopin, I. J. (June, 2007). Evolution of concepts of stress. *Stress*, 10(2), pp. 109–20.

Gouin, J. P. & Kiecolt-Glaser, J. K. (February, 2011). The Impact of psychological stress on wound healing: Methods and Mechanisms. *Immunology and allergy clinics of north america*, 31(1), pp. 81–93.

Herder, J. D. & Prasse, K. W. (1972). Leukocyte response in the dog and cat. *Iowa state university veterinarian*, 34(2), pp. 74-78.

Iki, T., Ahrens, F., Pasche, K. H., Bartels, A. & Erhard, M. H. (2011). Relationships between scores of the feline temperament profile and behavioural and adrenocortical responses to a mild stressor in cats. *Applied Animal Behaviour Science*, 132(1-2), pp. 71–80.

Indrayan, A. (2013). Clinical agreement in quantitative measurements. In S. A. R. Doi & G. M. Williams (Eds.), *Methods of clinical epidemiology*. (pp. 17-27). London: Springer

Joels, M. & Baram, T. Z. (June, 2009). The neuro-symphony of stress. *Nature reviews neuroscience*, 10(6), pp. 459–466.

Johnstone, C. P., Reina, R. D. & Lill, A. (October, 2012). Interpreting indices of physiological stress in free-living vertebrates. *Journal of comparative physiology B: biochemical, systemic, and environmental Physiology*, 182(7), pp. 861–879.

Juneau, P. (2007). Nonparametric methods in pharmaceutical statistics. In S. A. Dmitrienko, C. Chuang-Stein & R. D'Agostino (Eds.), *Pharmaceutical statistics using SAS: a practical guide*. (pp. 117-150). United States of America: SAS Publishing

Karagiannis, C. (2016). Stress as a risk factor for disease. In I. Rodan, & S. Heath (Eds.), *Feline behavioral health and welfare*. (pp. 138-147). China: Elsevier Inc.

Kessler, M.R. & Turner, D. C. (1997). Stress and adaptation of cats (*Felis silvestris catus*) housed singly, in pairs and in groups in boarding catteries. *Animal welfare*, 6, pp. 243-254.

Kim, J. J. & Diamond, D. M. (June, 2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature reviews: neuroscience*, 3, pp. 453–62.

Landsberg, G., Hunthausen, W. & Ackerman, L. (2013). *Behavior problems of the dog and cat*. (3rd ed.). China: Saunders, Elsevier

Langley-Hobbs, S. J. (2014). Female genital tract. In S. J. Langley-Hobbs, J. L. Demetriou & J. F. Ladlow (Eds.), *Feline soft tissue and general surgery*. (pp. 457-469). China: Saunders, Elsevier

Lazarus, R., & Cohen, B. (1977). Environmental stress. In I. Altman, & J. F. Wohlwill (Eds.), *Human behavior and environment: advances in theory and research*. (Vol. 2) (pp. 89-121). New York: Plenum Press.

Ley, J. M. (2016). Feline communication. In I. Rodan, & S. Heath (Eds.), *Feline behavioral health and welfare*. (pp. 24-33). China: Elsevier Inc

Lloyd, J. (August 22-24, 2014). Behaviour and welfare: minimising stress for patients in the veterinary hospital. *Presentations from the australian veterinary association north queensland branch conference*, pp. 62-64.

Lowe, A. (2016). Glucocorticoids in feline dermatology. In S. E. Little (Ed.), *August's consultations in feline internal medicine* (Vol. 7) (pp. 326-333). United States of America: Elsevier.

Lowe, A. D., Campbell, K. L. & Graves, T. (December, 2008). Glucocorticoids in the cat. *Veterinary dermatology*, 19(6), pp. 340–347.

Marshall, G. N., Davis, M. L. & Sherbourne, C. D. (1999). Stress and health: definitions and concepts. In G. N. Marshall, M. L. Davis & C. D. Sherbourne, *A review of the scientific literature as it pertains to gulf war illnesses: stress*. (Vol. 4) (pp. 11-15). Washington D.C.: RAND.

Mason, J. W. (1968). Organization of psychoendocrine mechanisms: the scope of psychoendocrine research. *Psychosomatic medicine*, 30(5), pp. 565–808.

McCobb, E. C., Patronek, G. J., Marder, A., Dinnage, J.D. & Stone, M. S. (February 15, 2005). Assessment of stress levels among cats in four animal shelters. *Journal of the american veterinary medical association*, 226(4), pp. 548-555

McEwen, B. S. & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43, pp. 2–15.

McEwen, B. S. (2005). Stressed or stressed out: what is the difference? *Journal of psychiatry and neuroscience*, 30(5), pp. 315–318.

McEwen, B. S. (July, 2007). Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiological reviews*, 87(3), 873–904.

McEwen, B. S. (2010). Stress: homeostasis, rheostasis, allostasis an allostatic load. In G. Fink, *Stress science: neuroendocrinology*. (pp. 3-9). Oxford, United Kingdom: Academic Press.

Mellor, D. J., Patterson-Kane, E. & Stafford, K. J. (2009). *The sciences of animal welfare*. Singapore: Wiley-Blackwell

Morgan, K.N. & Tromborg, C.T. (2007). Sources of stress in captivity. *Applied animal behaviour science*, 102, pp. 262–302.

Möstl, E. & Palme, R. (2002). Hormones as indicators of stress. *Domestic animal endocrinology*, 23(1-2), pp. 67–74.

Nesse, R. M., Bhatnagar, S. & Ellis, B. (2016). Evolutionary origins and functions of the stress response system. In G. Fink, *Stress: concepts, cognition, emotion and behavior - Handbook of stress: volume 1*. (pp. 95-101). United States of America: Academic Press.

Nesse, R. M., Curtis, G. C., Thyer, B. A., McCann, D. S., Huber-Smith, M. J. & Knopf, R. F. (1985). Endocrine and cardiovascular responses during phobic anxiety. *Psychosomatic Medicine*, 47(4), pp. 320–332.

Nibblett, B. M., Ketzis, J. K. & Grigg, E. K. (2015). Comparison of stress exhibited by cats examined in a clinic versus a home setting. *Applied animal behaviour science*, 173, pp. 68–75.

Novak, M. A., Hamel, A. F., Kelly, B. J., Dettmer, A. M. & Meyer, J. S. (2013). Stress, the HPA axis, and nonhuman primate well-being: A review. *Applied Animal Behaviour Science*, 143, pp. 135–149.

O'Brien, S. J. & Johnson, W. E. (July, 2007). The evolution of cats. *Scientific american*, pp. 68-75.

Overall, K. L. (2013). *Manual of clinical behavioral medicine for dogs and cats*. Canada: Elsevier Mosby.

Overall, K. L., Rodan, I., Beaver, B. V., Carney, H., Crowell-Davis, S., Hird, N., Kudrak, S. & Wexler-Mitchell, E. (December, 2004). *Feline behavior guidelines from the american association of feline practitioners*. Obtido em Abril de 2016, de American

association of feline practitioners: veterinary professionals passionate about the care of cats: <http://www.catvets.com/guidelines/practice-guidelines/behavior-guidelines>

Pacák, K. & Palkovits, M. (August, 2001). Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews*, 22(4), pp. 502–548.

Pacák, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I. J. & Goldstein, D. S. (October, 1998). Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *American journal of physiology*, 275(4), pp. 1247–1255.

Prickaerts, J. & Steckler, T. (2005). Effects of glucocorticoids on emotion and cognitive process in animals. In T. Steckler, N. H. Kalin & J. M. H. M. Reul (Eds.), *Handbook of stress and the brain - parte 1 the neurobiology of stress*. (2nd ed.) (pp. 359-386). The Netherlands: Elsevier

Quimby, J. M., Smith, M. L. & Lunn, K. F. (October, 2011). Evaluation of the effects of hospital visit stress on physiologic parameters in the cat. *Journal of feline medicine and surgery*, 13(10), pp. 733–737.

R Core Team (2016). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Raison, C.L & Milner, A. H. (September, 2003). When not enough is too much : the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *American journal psychiatry*, 160(9), pp. 1554–1565.

Reece, W. O. (2015). Regulation of respiration. In W. O. Reece, H. H. Erickson, J. P. Goff & E. E. Uemura (Eds.), *Dukes' physiology of domestic animals*. (13th ed.) (pp. 232-238). India: John Wiley & Sons, Inc.

Robertson, S. A. (2016). Acute Pain and Behavior. In I. Rodan, & S. Heath (Eds.), *Feline behavioral health and welfare*. (pp. 167-183). China: Elsevier Inc.

Rochlitz, I. (2014). Feline welfare issues. In D. C. Turner & P. Bateson, *The Domestic Cat: The Biology of its Behaviour*. (3rd ed.) (pp. 131-153). New York, United States of America: Cambridge University Press.

Rodan, I. & Cannon M. (2016). Housing cats in the veterinary practice. In I. Rodan & S. Heath (Eds.), *Feline behavioral health and welfare*. (pp. 122-136). China: Elsevier Inc.

Rodan, I. (2016). Importance of feline behavior in veterinary practice. In I. Rodan, & S. Heath (Eds.), *Feline behavioral health and welfare*. (pp. 2-11). China: Elsevier Inc.

Rodan, I., Sundahl, E., Carney, H., Gagnon, A.-C., Heath, S., Landsberg, G., Seksel, K. & Yin, S. (May, 2011). AAFP and ISFM feline-friendly handling guidelines. *Journal of feline medicine and surgery*, 13, pp. 364–375.

Rosch, P. J. (1998). *Reminiscences of hans selye, and the birth of "stress"*. Obtido em Abril de 2016, de The american institute of stress: <http://www.stress.org/about/hans-selye-birth-of-stress/>

Rudd, S., Demetriou, J. L. & Langley-Hobbs, S. J. (2014). Cats in the practice. In S. J. Langley-Hobbs, J. L. Demetriou & Jane F. Ladlow (Eds.), *Feline soft tissue and general surgery*. (pp. 67-74). China: Saunders, Elsevier

Schleifer, L. M., Ley, R. & Spalding T. W. (May, 2002). A hyperventilation theory of job stress and musculoskeletal disorders. *American journal of industrial medicine*, 41(5), pp. 420–432.

Schulte, P. M. (January, 2014). What is environmental stress: insights from fish living in a variable environment. *The journal of experimental biology*, 217(1), pp. 23–34.

Selye, H. (1976). History and general outline of the stress concept. In H. Selye, *Stress in health and disease*. (pp. 3-34). Boston, London: The Butterworth Group.

Sheriff, M. J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R. & Boonstra, R. (August, 2011). Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*, 166(4), pp. 869–887.

Sino Biological Inc. - Biological Solution Specialist. (2004-2016). *ELISA introduction*. Obtido em Maio de 2016, de ELISA encyclopedia: <http://www.elisa-antibody.com/>

Stanton, L. A., Sullivan, M. S. & Fazio, J. M. (2014). A standardized ethogram for the felidae: a tool for behavioral researchers. *Applied animal behaviour science*, 173, pp. 3–16.

Stella, J. L. & Buffington, C. A. T. (January 1, 2011). Sickness behaviors in response to unusual external events in healthy cats and cats with feline interstitial cystitis. *Journal of the american veterinary medical association*, 238(1), pp. 67–73.

Stella, J. L. & Buffington, C. A. T. (2014). Individual and environmental effects on health and welfare. In D. C. Turner, & P. Bateson, *The Domestic Cat: The Biology of its Behaviour*. (3rd ed.) (pp. 83-100). New York, United States of America: Cambridge University Press.

Stella, J. L. & Buffington, C. A. T. (2016). Environmental strategies to promote health and wellness. In S. E. Little (Ed.), *August's consultations in feline internal medicine* (Vol. 7) (pp. 718- 736). United States of America: Elsevier.

Stella, J., Croney, C. & Buffington, C. A. T. (2013). Effects of stressors on the behavior and physiology of domestic cats. *Applied animal behaviour science*, 143(2-4), pp. 157–163.

Stella, J., Croney, C. & Buffington, C. A. T. (2014). Environmental factors that affect the behavior and welfare of domestic cats (*Felis silvestris catus*) housed in cages. *Applied animal behaviour science*, 160, pp. 94–105.

Sterling, P. & Eyer, J. (1988). Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. In S. Fisher & J. Reason (Eds.), *Handbook of life stress, cognition, and health*. (pp. 629-649). New York: John Wiley & Sons.

Stewart, J. A. (2006). The detrimental effects of allostasis: allostatic load as a measure of cumulative stress. *Journal of physiological anthropology*, 25, pp. 133-145.

Tanaka, A., Wagner, D. C., Kass, P. H. & Hurley, K. F. (March, 2012). Associations among weight loss, stress, and upper respiratory tract infection in shelter cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 240(5), 570–576.

Vinson, G. P., Whitehouse, B. J. & Hinson, J. P. (2010). Adrenal cortex. In G. Fink (Ed.), *Stress science: neuroendocrinology*. (pp. 137-145). Oxford, United Kingdom: Academic Press.

Wielebnowski, N. C., Fletchall, N., Carlstead, K., Busso, J. M. & Brown, J. L. (2002). Noninvasive assessment of adrenal activity associated with husbandry and behavioral factors in the north american clouded leopard population. *Zoo biology*, 21(1), pp. 77–98.

## ANEXOS

## ANEXO I – CASUÍSTICA DESCRIMINADA NOS SERVIÇOS DE CIRURGIA, IMAGEM E MEDICINA INTERNA

## Cirurgia

Área	Espécie	Diagnóstico	Número de casos
Ortopédica	Canina	Amputação de cauda	1
		Amputação de dígito	2
		Amputação de membro por trauma	1
		Artrodese carpo	1
		Artrodese tarso	1
		Fixador externo	1
		Fratura de mandíbula	1
		Fratura na diáfise do fémur	2
		Fratura na diáfise do rádio	1
		Fratura na diáfise do rádio e ulna	2
		Fratura na diáfise do úmero	2
		Fratura no côndilo do úmero	3
		Luxação de rótula	4
		Não união do processo ancóneo	3
		Remoção de placa	1
		Ressecção da cabeça de fémur	3
		Rotura do ligamento cruzado caudal	1
		Rutura de ligamento colateral lateral	1
		TTA	8
	Felina	Fratura na diáfise do fémur	2
		Fratura da sínfise mandibular	1
		Luxação de rótula	1
		Remoção de fixador externo	2
Ressecção da cabeça de fémur		1	
Exótico	Fratura úmero	1	

Oncológica	Canina	Carcinoma das células de transição	1
		Epulide	3
		Esplenectomia por hemangiossarcoma	5
		Exérese de linfonodo para estadiamento	5
		Hemangiopericitoma	1
		Histiocitoma	2
		Leiomioma	2
		Lipoma	3
		Mastectomia	15
		Mastocitoma	3
		Neoplasia das glândulas hepatoídes	2
	Osteossarcoma	1	
	Felina	Carcinoma espinocelular	1
		Cistoadenoma quístico hepático	1
		Exérese de linfonodo para estadiamento	1
		Fibrossarcoma	2
		Hemangiopericitoma	1
		Linfoma intestinal	1
		Mastectomia	5
Mastocitoma		1	
Osteossarcoma	2		
Reconstrutiva	Canina	Ablação do conduto auditivo	1
		<i>Atresia ani</i>	1
		Enxerto livre	1
		Enxerto pediculado	1
		Fenda palatina	1
		Hérnia diafragmática	1
		Hérnia umbilical	1
		Hipoplasia do palato	1
	Felina	Septo vaginal	1
		Enxerto livre	1
		Enxerto pediculado	1
		Fenda palatina	1
		Hérnia abdominal	2
Dentária	Canina	Correção dentária	4
		Destartarização	11
		Exodontia	5
		Molde dentário	1

Dentária	Felina	Destartarização	3
		Exodontia	5
	Exótico	Odontoplastia	4
Reprodutiva	Canina	Cesariana	1
		Orquiectomia	20
		OVH	18
		Piômetra	3
	Felina	Orquiectomia	22
		OVH	38
		Piômetra	3
Exótico	Orquiectomia	2	
Gastrointestinal	Canina	Invaginação intestinal	1
		Gastropexia	3
		Pilorooplastia	2
		Remoção de corpo estranho	2
Nefrologia	Canina	Colocação de cateter de Foley por carcinoma das células de transição	1
		Rotura de bexiga	1
	Felina	Cistotomia	1
Neurológica	Canina	Hemilaminectomia	2
		Luxação atlanto-ocipital	1
		Ventral slot	4
	Felina	Hemilaminectomia	1
Oftálmica	Canina	Cataratas	3
		Colocação de lente intra-ocular	1
		Enucleação	1
		Prolapso membrana nictitante	2
	Felina	Colocação de membrana amniótica	1
		Enucleação	1
		Sequestro de córnea	1
Respiratória	Canina	<i>Stent</i> por colapso de traqueia	1
Cardíaca	Canina	Pericardiectomia	1
		Persistência do canal arterial	1
Variada	Canina	Biópsia tecidos moles	7
		Colecistectomia	2
		Dreno torácico	1
		Exérese de sialocelo	1

Variada	Canina	Exérese granuloma	1
		Laparotomia exploratória	1
		Lobectomia hepática	3
		Mucocele biliar	2
		Nodulesctomia	9
		Omentalização da próstata	1
		Sonda esofágica	3
	Felina	Biópsia tecidos moles	3
		Nodulesctomia	1
	Exótico	Nodulesctomia	1

## Imagem

Área	Espécie	Diagnóstico	Número de casos
Raio – X	Canina	Abdominal	20
		Carpo	2
		Coluna cervical	2
		Coluna toraco-lombar	4
		Coxo-femural	9
		Fémur	2
		Femuro-tibio-patelar	7
		Intra-oral	3
		Metacarpo	1
		Mielografia	13
		Rádio/Ulna	2
		Tarsometatarsica	2
		Tíbia	1
		Tibiotársico	1
		Torácico	28
		Úmero	2
		Úmero-radio-ulnar	3
		Vagino-uretrografia	2
	Felina	Abdominal	9
		Coluna cervical	1
		Coluna toraco-lombar	1
		Intra-oral	8
		Tíbia	1
		Torácico	11
		Úmero	1
		Úmero-rádio-ulnar	1
	Exótica	Abdominal	1
		Arcada dentária	3
Torácico		1	

Tomografia Computorizada	Canina	Abdominal	8
		Cavidade nasal	1
		Cervical	2
		Cranio-encefálica	5
		Mielografia	12
		Torácica	4
		Toraco-lombar	1
		Abdominal	8
	Felina	Cavidade nasal	1
		Cervical	2
		Abdominal	2
		Cranio-encefálica	2
		Escápulo-úmeral	1
	Exótico	Torácico	3
Torácico		1	
Ecografia	Canina	Abdominal	13
		Cistocentese	2
		Citologia óssea	3
		Citologia tecidos moles	3
		Ecocardiografia	2
	Felina	Abdominal	11
		Cistocentese	3
		Ecocardiografia	1
Endoscopia	Canina	<i>Atresia ani</i>	1
		Gastrointestinal por corpo estranho	2
		Vias respiratórias	2
	Felina	Gastrointestinal por corpo estranho	1
Fluoroscopia	Canina	<i>Shunt</i> porto-sitémico	2
Outros exames complementares	Canina	Análise de sedimento urinário	1
		Citologia de pele	6
		Citologia por aposição	1
		ECG	2
		Microhematócrito	4
		PAAF	8
		Pesquisa de ácaros	3
		Teste de fluoresceína	2
	Felina	ECG	1
		Microhematócrito	1
		Dermatófitos	2

## Medicina Interna

Área	Espécie	Diagnóstico	Número de casos
Medicina preventiva	Canina	Desparasitação externa	11
		Desparasitação interna	12
		Microchip	5
		Vacinação	62
	Felina	Desparasitação externa	5
		Desparasitação interna	4
		Microchip	2
		Vacinação	18
	Exótica	Desparasitação interna	2
		Vacinação	3
Ortopédica	Canina	Artrose do carpo	2
		Displasia de anca	12
		Displasia de cotovelo	1
		Doença degenerativa articular	1
		Espondilose anquilosante	1
		Fratura de tíbia	1
		Fratura de vertebra	1
		Fratura do osso peniano	1
		Fratura de fémur	2
		Fratura de mandíbula	1
		Fratura do metacarpo	1
		Luxação atlanto-ocipital	1
		Luxação de rótula	5
		Luxação tarsometatarsica	1
		Não união do processo anconeu	1
		Osteocondrite dissecante	1
		Panosteíte	1
		Processo inflamatório carpo	1
		Rotura do ligamento cruzado craneal	6
	Felina	Esclerose úmero-rádio-ulnar	1

Ortopédica	Felina	Fratura de tíbia	1
		Fratura patológica	1
		Luxação de rótula	2
	Exótico	Lesão da tíbia não especifica	1
Oncológica	Canina	Carcinoma espinocelular	1
		Carcinoma mamário	10
		Carcinomatose peritoneal	1
		Hemangiossarcoma	4
		Histiocitoma	2
		Linfoma multicêntrico	10
		Lipoma	9
		Massa hepática não especificada	2
		Mastocitoma	10
		Melanoma	2
		Neoplasia carcinomatosa primária	1
		Neoplasia das glândulas hepatoídes	1
		Neoplasia do estroma gastrointestinal	2
		Neoplasia intracardiaca	1
		Neoplasia neuroendócrina	1
	Neoplasia pulmonar primária	4	
	Osteossarcoma	4	
	Quemodectoma	1	
	Felina	Carcinoma espinocelular	2
		Carcinoma mamário	5
		Cistoadenoma apócrino	1
		Fibrossarcoma	4
		Hemangioma cavernoso	1
		Linfoma intestinal	2
		Linfoma multicêntrico	6
Neoplasia pulmonar primária		1	
Osteoma mamário		1	
Osteossarcoma		2	

Neurológica	Canina	Atrofia muscular neurológica	1
		Epilepsia	5
		Hérnia discal cervical	3
		Hérnia discal lombar	6
		Hérnia discal torácica	2
		Meningite	1
		Polirradiculoneuropatia	2
		Síndrome vestibular periférico	4
Felina	Epilepsia	1	
Cirúrgica	Canina	Pré-operatória	11
		Pós-operatória	7
	Felina	Pré-operatória	6
		Pós-operatória	4
Nefrologia	Canina	Cistite crónica	1
		Glomerulonefrite crónica	1
		Infeção do trato urinário	2
		Insuficiência renal aguda	2
		Monitorização de insuficiência renal	3
		Urolitíase	1
	Felina	Cálculos urinários	1
		Cistite idiopática felina	3
		Infeção do trato urinário	2
		Insuficiência renal aguda	3
		Monitorização de insuficiência renal	10
		Periúria comportamental	2
Urolitíase	2		
Dentária	Canina	Abcesso dentário fistulado	2
	Felina	Abcesso dentário	1
		Estomatite e gengivite por reabsorção dentária	2
Respiratória	Canina	Bronquite crónica	3
		Colapso da traqueia	4
		Infeção do trato respiratório superior	3

<b>Respiratória</b>	Felina	Asma	4
		Parasitas pulmonares	1
<b>Dermatológica</b>	Canina	Atopia	5
		Demodecose	1
		Dermatite alérgica à picada de pulga	6
		Dermatofitose	1
		Otite bacteriana	2
		Otite crónica	3
		Otite por corpo estranho	3
		Otite por malassezia	9
		Otite por otodectes	2
		Piododermatite	7
	Pododermatite	3	
	Felina	Alopecia por <i>Notoedres cati</i>	1
		Atopia	1
		Dermatite piotraumática	1
Dermatofitose		2	
<b>Gastrointestinal</b>	Canina	Colite não especificada	2
		Corpo estranho	2
		Enterite parasitária	3
		Enterite por indiscrição alimentar	2
		Gastrite crónica	1
		Gastrite por indiscrição alimentar	3
		Gastroenterite de origem desconhecida	4
		Gastroenterite por corpo estranho	1
		Tenesmo de origem desconhecida	1
		Úlcera gástrica	2
	Felina	Gastrite por indiscrição alimentar	2
Gastroenterite de origem desconhecida		3	
Megacólon		1	
<b>Reprodutiva</b>	Canina	Galactorreia	1
		Piómetra	5
		Prostatomegália	4
		Quistos prostáticos	3
		Tumor testicular	2

<b>Reprodutiva</b>	Felina	Piómetra	1
<b>Oftálmica</b>	Canina	Cataratas	1
		Conjuntivite	2
		Glaucoma	1
		Queratoconjuntivite seca	1
		Úlcera de córnea	4
		Uveíte	1
	Felina	Melanose difusa da íris	1
		Neoplasia da íris	1
<b>Cardiológica</b>	Canina	Dirofilariose	2
		Estenose pulmonar	1
		Insuficiência cardíaca secundária a doxorubicina	1
		Insuficiência valvular	12
	Felina	Cardiomiopatia restritiva	1
<b>Hematologia</b>	Canina	Anemia crónica não regenerativa	1
		Hipoplasia linfoide	1
		Trombocitopénia imunomediada primária	1
<b>Endocrinologia</b>	Canina	Cushing	2
		Diabetes <i>mellitus</i>	3
		Hipotiroidismo	2
	Felina	Diabetes <i>mellitus</i>	1
		Hiperparatiroidismo nutricional secundário	1
		Hipertiroidismo	2
<b>Doença infecto-contagiosa</b>	Canina	Despiste de leishmaniose	4
		Esgana	3
		Leishmaniose	3
		Tosse do canil	2
	Felina	Calicivírus	1
		Coriza	1
		Coronavírus	1
		Despiste de FIV/ FeLV	4
		Panleucopénia	1
<b>Variada</b>	Canina	Abcesso	1
		Abdominocentese	2
		<i>Atresia ani</i>	1
		Atropelamento	7

Variada		Check up geral	1
		Contato com proçessionária	1
		Doseamento de fenobarbital	2
		Eutanásia	6
		Fenda palatina	1
		Fístula perianal	1
		Granuloma	1
		Hepatocolangite	1
		Hepatopatia não especificada	3
		Indiscriminado	18
		Ingestão de rodenticidas	2
		Laceração traumática	7
		Megaesófago	1
		Mucocelo biliar	1
		Otohematoma	5
		Pancreatite	2
		Quisto retenção queratina	2
		Reação adversa a desparasitante	1
		Serviço de enfermagem	1
		Sialocelo	1
	Sonda naso-esofágica	4	
	Felina	Atropelamento	2
		Eutanásia	2
		Fenda palatina	1
		Fístula perianal	2
		Hepatocolangite	1
		Hepatopatia não especificada	1
		Indiscriminado	6
		Laceração traumática	1
		Pancreatite	2
		Pólipo nasofaríngeo	1
		Serviço de enfermagem	3
	Toracocentese	2	
Exótico	Pterofagia com causa desconhecida	1	



**ANEXO II – CAT-STRESS-SCORE (KASSLER & TURNER, 1997)**

<b>Score</b>	<b>Body</b>	<b>Stomach</b>	<b>Legs</b>	<b>Tail</b>	<b>Head</b>
<b>1. Fully Relaxed</b>	Laid out on side or on back	Exposed, slow ventilation	Fully extended	Extended or loosely wrapped	Laid on surface with chin up or on surface
<b>2. Weakly Relaxed</b>	i: laid ventrally or half on side or sitting a: standing or moving, back horizontal	Exposed or not, slow or normal ventilation	i: bent, hind legs may be laid out A: when standing, extended	i: extended or loosely wrapped a: up or loosely downwards	Laid on surface or over the body, some movement
<b>3. Weakly Tense</b>	i: laid ventrally or sitting a: standing or moving, body behind lower than in front	Not exposed, normal ventilation	i: bent a: when standing, extended	May be twitching i: on the body or curved backwards a: up or tense downwards	Over the body, some movement
<b>4. Very Tense</b>	i: laid ventral, rolled or sitting a: standing or moving, body behind lower than in front	Not exposed, normal ventilation	i: bent a: when standing, hind legs bent in front extended	i: close to the body a: tense downwards or curled forward, may be twitching	Over the body or pressed to body, little or no movement
<b>5. Fearful, Stiff</b>	i: laid ventrally or sitting a: standing or moving, body behind lower than in front	Not exposed, normal or fast ventilation	i: bent a: bent near to surface	i: close to the body a: curled forward close to the body	On the plane of the body, less or no movement
<b>6. Very Fearful</b>	i: laid ventrally or crouched directly on top of all paws, may be shaking a: whole body near to ground, crawling, may be shaking	Not exposed, fast ventilation	i: bent a: bent near to surface	i: close to the body a: curled forward close to the body	Near to surface, motionless
<b>7. Terrified</b>	Crouched directly on top of all fours, shaking	Not exposed, fast ventilation	Bent	Close to the body	Lower than the body, motionless

i: (or unspecified) = cat is inactive, a: = cat is active

<b>Score</b>	<b>Eyes</b>	<b>Pupils</b>	<b>Ears</b>	<b>Whiskers</b>	<b>Vocal</b>	<b>Activity</b>
<b>1. Fully Relaxed</b>	Closed or half opened, may be blinking slowly	Normal	Half-back (normal)	Lateral (normal)	None	Sleeping or resting
<b>2. Weakly Relaxed</b>	Closed, half opened or normal opened	Normal	Half-back or erected to front or back and forward on head	Lateral or forward	None	Sleeping, resting, alert or active, may be playing
<b>3. Weakly Tense</b>	Normal opened	Normal	Half-back or erected to front or back and forward on head	Lateral or forward	Meow or quiet	Resting awake or actively exploring
<b>4. Very Tense</b>	Widely open or pressed together	Normal or partially dilated	Erected to front or back, or back and forward on head	Lateral or forward	Meow, plaintive meow or quiet	Cramped sleeping, resting or alert may be actively exploring, trying to escape
<b>5. Fearful, Stiff</b>	Widely opened	Dilated	Partially flattened	Lateral or forward or back	Plaintive meow, yowling, growling or quiet	Alert, may be actively trying to escape
<b>6. Very Fearful</b>	Fully opened	Fully dilated	Fully flattened	Back	Plaintive meow, yowling, growling or quiet	Motionless, alert or actively prowling
<b>7. Terrified</b>	Fully opened	Fully dilated	Fully flattened back on head	Back	Plaintive meow, yowling, growling or quiet	Motionless

i: (or unspecified) = cat is inactive, a: = cat is active

### ANEXO III - CURVAS PADRÃO DOS SISTEMAS ELISA EIA-1887 UTILIZADOS

