

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA VETERINÁRIA
CIÊNCIAS CLÍNICAS

TESE

**Respostas fisiológicas de potros submetidos à
marcação e ao desmame na prática agropecuária**

Tatianne Leme Oliveira Santos Godoi

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA
CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**Respostas fisiológicas de potros submetidos à
marcação e ao desmame na prática agropecuária**

TATIANNE LEME OLIVEIRA SANTOS GODOI

Sob a Orientação da Professora
Magda Alves de Medeiros

e Coorientação do Professor
Fernando Queiroz de Almeida

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária na área de Concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Junho de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G588r Godoi, Tatianne Leme Oliveira Santos , 1983-
Respostas fisiológicas de potros submetidos à
marcação e ao desmame na prática agropecuária /
Tatianne Leme Oliveira Santos Godoi. - 2018.
113 f.: il.

Orientadora: Magda Alves de Medeiros.
Coorientador: Fernando Queiroz de Almeida.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA CIÊNCIAS CLÍNICAS , 2018.

1. Cavalo. 2. Bem-estar animal. 3. Variabilidade
da Frequência Cardíaca. I. Medeiros, Magda Alves de,
1973-, orient. II. Almeida, Fernando Queiroz de, 1959
, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
VETERINÁRIA CIÊNCIAS CLÍNICAS . IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

TATIANNE LEME DE OLIVEIRA SANTOS GODOI

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Medicina Veterinária, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 27/06/2018



MAGDA ALVES DE MEDEIROS (Ph. D) UFRRJ
(orientador)



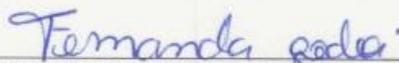
DANIEL PENTEADO MARTINS DIAS (Ph. D) CBM



FELIPE GOMES FERREIRA PADILHA (Ph. D) UFF



ANNA PAULA BALESDENT BARREIRA DE SA PACHECO (Ph. D) UFRRJ



FERNANDA NASCIMENTO DE GODOI (Ph. D) UFRRJ

DEDICATÓRIA

Tudo o que eu tenho, tudo o que eu sou, foi me dado por Deus. A Ele, acima de tudo e de todos dedico este trabalho e também minha vida. Dedico este trabalho também a meu esposo Aloizio, meu filho Gabriel, meus pais Felipe e Vânia, e em especial a minha orientadora Magda, que me apoiou neste árduo trabalho.

AGRADECIMENTOS

Meu primeiro agradecimento é dedicado a DEUS, que durante toda minha vida, das mais variadas formas, mesmo que às vezes eu não compreenda, tem atuado de forma a moldar e aperfeiçoar meu caráter, por conhecer minhas necessidades melhor do que eu mesmo e supri-las de forma maravilhosa, pela salvação em JESUS CRISTO, pelo Perdão, pela Vida...

À MINHA FAMÍLIA que me apoiou em todos os momentos e decisões da minha vida, o meu muito obrigado para meu esposo Aloizio, meu filho Gabriel, meus pais Felipe e Vânia.

À UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, por ter sido cenário de momentos marcantes em minha vida, pela minha graduação e pós-graduação, pela sua beleza, por ser única...

A todos os FUNCIONÁRIOS E ESTAGIÁRIOS do Setor de Equinocultura.

Ao meu chefe COORDENADOR EVERTON DA SILVA MATTOS, pela liberação dos animais, e disponibilizar condições da execução dos experimentos.

Aos PROFESSORES do Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, pelos conhecimentos transmitidos.

À BANCA EXAMINADORA, por aceitarem o convite e pelas importantes sugestões.

Aos meus AMIGOS da PÓS-GRADUAÇÃO, pela amizade e companheirismo.

Ao meu coorientador FERNANDO QUEIROZ DE ALMEIDA por aceitar o desafio do meu projeto e disponibilizar as fitas cardíacas do LADEQ.

E finalmente, com especial carinho, à minha orientadora **MAGDA ALVES DE MEDEIROS**, por ter me acolhido como orientada, pela atenção e dedicação, pelo conhecimento transferido, pela agradável convivência e pelo apoio incondicional durante este trabalho. A minha gratidão a esta professora que foi peça chave na minha formação.

BIOGRAFIA

Tatianne Leme Oliveira Santos Godoi, nascida em 26 de maio de 1983, em São Paulo, SP. No ano de 2002, ingressou no curso de Medicina Veterinária, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, graduando-se em 2007. Durante a graduação, ao cursar a disciplina de Fisiologia Animal I, conheceu a professora Magda Alves Medeiros.

Em 2004, iniciou o estudo da acupuntura, através da participação em grupos de estudo e cursos de extensão coordenado pela professora Magda. Em 2006, foi oficialmente criado o setor de acupuntura do Hospital Veterinário de Pequenos Animais, sendo uma das primeiras estagiárias do setor, coordenado pela professora Magda. Até a presente data, tem colaborado continuamente através da participação em projetos de extensão na área de acupuntura veterinária. Aperfeiçoou-se em Acupuntura através da pós-graduação lato sensu no Incisa (2011).

Prosseguiu a vida acadêmica, iniciando em 2009 o Mestrado no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) na UFRRJ, na área de ciências clínicas, sob orientação da Professora Magda Alves Medeiros e coorientação do Professor Fernando Queiroz de Almeida, defendendo a dissertação “Influência da fármaco-acupuntura nas respostas de estresse de equinos durante o transporte rodoviário.” Obtendo o título de Mestre em Ciências (2011).

Em 2010, tornou-se servidora da UFRRJ, sendo responsável pelo setor de Equinos até 2017. Observando a rotina do setor de trabalho e desejando acrescentar melhorias no bem-estar animal continuou os estudos e, em 2014, ingressou no Doutorado no PPGMV na mesma instituição, sob a mesma orientação e coorientação do mestrado. No dia 27 de junho de 2018 defendeu a presente tese “Respostas fisiológicas de potros submetidos à marcação e ao desmame na prática agropecuária”, com aprovação pela banca examinadora nesta mesma data. Através dos resultados obtidos pelos experimentos do doutorado pretende inserir melhorias no manejo dos animais de produção da UFRRJ, proporcionando melhores condições de bem-estar animal em geral.

RESUMO GERAL

GODOI, Tatianne Leme Oliveira Santos. **Respostas fisiológicas de potros submetidos à marcação e ao desmame na prática agropecuária.** 2018. 96p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Muitas técnicas de manejo de animais de produção invariavelmente produzem estresse e comprometem o bem-estar animal. Um melhor entendimento sobre o efeito do estresse pode ajudar o desenvolvimento de estratégias para redução dos efeitos deletérios do mesmo. Neste sentido, a acupuntura tem sido uma ferramenta da medicina complementar muito utilizada na redução do estresse. O presente estudo teve o objetivo de avaliar, através das respostas fisiológicas (variabilidade da frequência cardíaca (HRV)) e análises comportamentais, duas práticas agropecuárias muito utilizadas e de grande impacto em potros: marcação e desmame. Para análise do HRV, os intervalos RR foram gravados pelo frequencímetro cardíaco Polar Equine®, e o comportamento foi filmado para posterior análise através do etograma. No primeiro capítulo foi analisada a prática de identificação através do uso da marcação permanente em potros. O objetivo foi comparar a marcação a quente (ferro candente) e a marcação a frio (nitrogênio líquido) quanto ao estresse e a qualidade da marca. Na marcação foi utilizado o símbolo 47 (6,5X8,5 cm) no braço esquerdo, em 23 potros. Os animais foram divididos em: grupo fogo (n=11) e grupo nitrogênio (n=12). Na análise do HRV observou-se no momento da marcação, um aumento significativo no grupo fogo nos valores da frequência cardíaca (HR), na potência de banda de baixa frequência (LF), na razão LF/HF, no desvio padrão de todos os intervalos RR normais (SDNN) e diminuição na potência de banda de alta frequência (HF) sugerindo ativação autonômica de predomínio simpático sobre o parassimpático, representando maior nível de estresse no grupo fogo em comparação ao nitrogênio. Na avaliação comportamental, no grupo fogo, foram notados intensos movimentos dos membros comparado ao nitrogênio. No segundo capítulo foi avaliado o desmame dos equinos como um processo estressor. O objetivo foi comparar as respostas fisiológicas e comportamentais dos potros desmamados, quando submetidos a três grupos de tratamentos previamente ao desmame. Grupo Controle (n=9), sem manipulação; grupo Sham (n=8), acupuntura falsa localizada a uma distância de 2 cm dos pontos VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1; grupo Acupuntura (n=9), acupuntura nos pontos VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1. No sétimo dia antes do desmame, foram iniciados os tratamentos, que ocorreram em dias alternados. Para realização do desmame foi utilizado o método em grupos com a presença de uma égua adulta sem parentesco com os potros. O desmame, induziu respostas autonômicas, no HRV, e resposta comportamentais, indicativas de estresse em todos os tratamentos (Controle, Sham e Acupuntura). As práticas agropecuárias, envolvendo marcação e desmame, geraram importantes alterações fisiológicas e comportamentais, indicativas de estresse, porém métodos alternativos como a marcação a frio têm proporcionado menores níveis de estresse quanto a análise do HRV. O estudo do estresse que envolve os manejos da rotina em geral é importante para avaliação e manutenção do bem-estar animal.

Palavras-chaves: cavalo, bem-estar animal, variabilidade da frequência cardíaca.

ABSTRACT

GODOI, Tatianne Leme Oliveira Santos. **Physiological responses of foals submitted branding and weaning in agricultural practice.** 2018. 96p. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine). Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Many animal production management techniques invariably produce stress and compromise animal welfare. A better understanding of stress effects can help develop strategies to reduce the deleterious effects of stress. In this sense, acupuncture has been a complementary medicine tool widely used in stress reduction. The present study had the objective of evaluating, through the physiological responses (heart rate variability (HRV)) and behavioral analysis; two widely used agricultural practices with great impact on foals: branding and weaning. For HRV analysis, the RR intervals were recorded by the Polar Equine® heart rate monitor, and the behavior was recorded for further analysis using the etogram. In the first chapter, the practice of identification through the use of permanent branding in foals was analyzed. The objective was to compare hot branding (hot iron) and cold branding (liquid nitrogen) for stress and brand quality. In branding it was used the symbol 47 (6.5X8.5 cm) in the left arm in 23 foals. The animals were split into fire group (n = 11) and nitrogen group (n = 12). In the HRV analysis, a significant increase in heart rate (HR), low frequency band (LF), LF / HF ratio, standard deviation of all normal RR intervals (SDNN) and decrease in the power of high frequency band (HF) suggesting autonomic activation of sympathetic predominance over the parasympathetic, representing a higher level of stress in the fire group compared to nitrogen. In the behavioral evaluation, in the fire group, intense movements of limbs were observed compared to nitrogen. At the second chapter, we evaluated the weaning of horses as a stressful process. The objective was to compare the physiological and behavioral responses of weaning foals when submitted to three treatment groups prior to weaning. Control Group (n = 9), without manipulation; Sham group (n = 8), false acupuncture located at a distance of 2 cm from points VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1; Acupuncture group (n = 9), acupuncture points VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1. On the seventh day before weaning, treatments were started, which occurred on alternate days. For weaning, the method was used in groups with the presence of an adult mare that was not related to the foals. Weaning induced autonomic responses in HRV and behavioral response indicative of stress in all treatments (Control, Sham and Acupuncture). The agricultural and livestock practices, involving marking and weaning, generated important physiological and behavioral changes, indicative of stress, but alternative methods such as cold marking have provided lower levels of stress in HRV analysis. The study of stress that involves routine management in general is important for the evaluation and maintenance of animal welfare.

Key words: horse, animal welfare, heart rate variability.

LISTA DE TABELAS, QUADROS, FIGURAS

Tabela 1: Descrição dos comportamentos avaliados durante a marcação a fogo e a nitrogênio líquido.	28
Tabela 2: Escore de reatividade durante a marcação.	29
Tabela 3: Análise comportamental durante a marcação com fogo e nitrogênio líquido por 60 segundos.	34
Tabela 4: Análise comportamental durante a marcação com fogo e nitrogênio líquido por 12 segundos.	35
Tabela 5: Análise do fator sexo na reatividade a dor durante a marcação.	35
Tabela 6: Escore na avaliação das marcações a fogo e a nitrogênio.	41
Tabela 7: Escore de nitidez nas marcações no grupo fogo e no grupo nitrogênio.	41
Tabela 8: Descrição dos comportamentos avaliados, adaptado de Nicol et al.(2005a).	62
Tabela 9: Comportamento entre machos e fêmeas.	73
Quadro 1: Escore de descrição das mudanças ocorridas na pele e a nitidez após as marcações a fogo e a nitrogênio líquido. Adaptado de Erber (2012b).	30
Quadro 2: Localização e descrição dos acupontos, adaptados de Maciocia, (2007); Schoen (2006).	59
Quadro 3: Análise Comportamental do desmame, adaptada de Nicol et al. (2005).	62
Figura 1: Frequencímetro Polar Equine modelo (Equine RS800cx). Ilustração do fabricante (Polar Equine®, 2011).	7
Figura 2: Ilustração esquemática do protocolo experimental.	22
Figura 3: (A). Momento da marcação de um animal do grupo fogo. (B). Fogareiro aquecendo o marcador.	24
Figura 4: (A). Momento da marcação de um animal do grupo nitrogênio. (B). Marcador sendo congelado em um isopor utilizando nitrogênio líquido.	24
Figura 5: Gráfico das oscilações da Frequência Cardíaca pelo intervalo de tempo, disponibilizado pelo programa Polar ProTrainer 5®.	25
Figura 6: Análise da HRV, através do domínio do tempo, programa Cardio Series v 2.4®, demonstrando o tacograma com valores de RR(ms) em função do tempo(s).	26
Figura 7: Análise da HRV, domínio da frequência, através da Transformada Rápida de Fourier, programa Cardio Series v 2.4®.	26
Figura 8: Fotografia representando o escore 5 de reatividade no momento da marcação a fogo.	29
Figura 9: Índices da Variabilidade da Frequência Cardíaca em resposta marcação a quente com	

ferro incandescente (grupo fogo n= 10) e da marcação a frio utilizando ferro com nitrogênio líquido (grupo nitrogênio n=8) em potros da raça mangalarga marchador e mestiços. Os dados são apresentados como média \pm EPM, nos momentos Basal, marcação, pós 30 e pós 60. (A) Razão LF/HF. (B) Componente de baixa frequência LF. (C) Componente de alta frequência HF. (D) Frequência Cardíaca Média. (E) RMSSD (raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, em um intervalo de tempo, expresso em ms). (F) SDNN (desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo, expresso em ms). (G) SDNN/RMSSD. (*) Diferença significativa no fator interação grupo x tempo. (#) Diferença significativa no fator tempo. (°) diferença significativa no fator grupo. 32

Figura 10: Efeito das marcações no grupo fogo e no grupo nitrogênio quanto aos níveis de cortisol de potros. Os dados são apresentados como média \pm EPM nos momentos Basal (n=6), após 30 minutos da marcação (n=6) e 60 min após marcação(n=6). Análise através da ANOVA de duas vias (p < 0,05). Os animais marcados com ferro frio foram representados como Nitrogênio e os animais marcados com ferro quente foram representados como Fogo. 33

Figura 11: Fotografia demonstrando a evolução da marcação no grupo fogo em diferentes momentos no mesmo animal. (T) Pele tricotomizada antes da marcação. (D) Momento imediatamente após a marcação. (30') 30 Minutos após a marcação. (1D) Um dia após a marcação. (6D) Seis dias após a marcação. (12D) Doze dias após a marcação. (25D) Vinte e cinco dias após a marcação. (45D) Quarenta e cinco dias após a marcação. (2M) Dois meses após a marcação. (3M) Três meses após a marcação. (4M) Quatro meses após a marcação. (5M) Cinco meses após a marcação. (6M) Seis meses após a marcação. (7M) Sete meses após a marcação. 37

Figura 12: Fotografia demonstrando a evolução da marcação no grupo nitrogênio em diferentes momentos no mesmo animal. (T) Pele tricotomizada antes da marcação. (D) Momento imediatamente após a marcação. (30') 30 Minutos após a marcação. (1D) Um dia após a marcação. (6D) Seis dias após a marcação. (12D) Doze dias após a marcação. (25D) Vinte e cinco dias após a marcação. (45D) Quarenta e cinco dias após a marcação. (2M) Dois meses após a marcação. (3M) Três meses após a marcação. (4M) Quatro meses após a marcação. (5M) Cinco meses após a marcação. (6M) Seis meses após a marcação (7M) Sete meses após a marcação. 38

Figura 13: Foto de dois potros manga-larga marchador em perfil lateral. (A) Animal marcado a fogo. (B) Animal marcado a nitrogênio. 39

Figura 14: Feridas mais intensas encontradas nas marcações a fogo no período de 6 a 12 dias

após a marcação, em seis diferentes animais.	40
Figura 15: Ilustração esquemática do protocolo experimental.	55
Figura 16: Fotografia do piquete desmame. Potros no momento 1H e a égua madrinha esquerda.	56
Figura 17: Alimentação dos animais durante o desmame	57
Figura 18: Esboço do corpo do cavalo mostrando as localizações dos pontos de acupuntura (círculos vermelhos) e não pontos/ sham (círculos abertos). VG: Vaso Governador, B: Bexiga	60
Figura 19: Aplicação de agulha em um animal do grupo acupuntura durante o tratamento pré-desmame.	60
Figura 20: Fotografia do comportamento apurado, conforme a duração em segundos. (A): Animais apresentando a atividade de andar. (B): Animal da esquerda apresentando o comportamento de alerta, enquanto os animais da direita estão realizando o comportamento de alimentação. (C): Animal da esquerda apresentando cânter, e o animal na direita em repouso. (D) Animal deitado.	63
Figura 21: Fotografia do comportamento apurado em número de acontecimentos. (A): Animais apresentando a atividade de cavar na água com o membro anterior esquerdo. (B): Atividade de lamber o coxo. (C): Comportamento antissocial. (D): Atividade de relinchar. (E): Interação social. (F): Eliminação. (G): Tentativa de mamar. (H): Investigar com a cabeça para fora da cerca.	64
Figura 22: Análise da HRV no desmame dos potros da UFRRJ. Os tratamentos foram: grupo Controle (n= 8), grupo acupuntura falsa ou Sham (n=7) e grupo acupuntura (n=7). Os dados são apresentados como média ± EPM, nos momentos -7D, -1D, 0D, D5 min, D25min, D 45min, D6h, D24h, 7D, 14D. (A) Razão LF/HF. (B) Componente de baixa frequência LF. (C) Componente de alta frequência HF. (D) Frequência Cardíaca Média (BPM). (E) RMSSD (raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, em um intervalo de tempo, expresso em ms). (F) SDNN (desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo, expresso em ms). (G) SDNN/RMSSD. Os símbolos (*,#,°,+) indicam diferença significativa no fator entre determinados momentos conforme descrito a seguir.(A): (*)-7D, -1D, 0D, D24h, 7D e 14D; (°)-7D, 7D, 14D; (≠) D5min, D25min, D6h, D24h. (B) e (C): (*)-7D, 7D e 14D; (≠) D5min, D25min, D45min, D6h, D24h. (D): (*)-7D, -1D, 0D, D24h, 7D e 14D; (#)-7D, -1D, 0D, 7D e 14D. (E): (*) -7D, -1D, 7D e 14D; (+): 0D, D24h; (°)-1D e 14D; (≠) D5min, D25min, D45min, D6h, D24h. (G): (*)-7D, -1D, 0D, 7D e 14D; (≠) D5min, D25min, D45min, D6h. Teste de Tukey, p<0,05.	68

Figura 23: Análise do comportamento por tempo dos acontecimentos num intervalo de análise por 20 minutos primeira hora, quinta hora e 23^a hora após o desmame dos potros da UFRRJ. Os tratamentos foram: grupo Controle (n= 9), grupo acupuntura falsa ou Sham (n=8) e grupo acupuntura (n=9). Os dados são apresentados como média ± EPM. (A), repouso, (B) alerta, (C) andar, (D) marcha e /ou cânter, (E) alimentação. (A, B, C, D). (*) Diferença significativa no fator tempo da 1^a hora em relação a 5^a hora e a 23^a hora. (E) # diferença significativa no fator tempo da 23^a hora em relação a 1^a hora. 70

Figura 24: Análise do comportamento por número de acontecimentos num intervalo de análise por 20 minutos, na primeira hora, quinta hora e 23^a hora após o desmame dos potros da UFRRJ. Os tratamentos foram: grupo Controle (n= 9), grupo acupuntura falsa ou Sham (n=8) e grupo acupuntura (n=9). Os dados são apresentados como média ± EPM. (A) interação social, (B) agressão, (C) investigação, (D) movimento de cavar, (E) tentativa de mamar, (F) ato de lambar, (G) eliminação, (H) relinchar. (D –E) * indica diferença significativa entre os tempos 1^a hora e 23^a horas. (F, G, H) *indica diferença significativa da 1^a hora em relação a 5^a hora e a 23^a hora. (C) todos os tempos são diferentes entre si..... 72

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico
Acup: Grupo de acupuntura de tratamento
ANOVA: Análise de Variância
AVP: Vasopressina
B23: Ponto de acupuntura 23 do meridiano Bexiga
B49: Ponto de acupuntura 49 do meridiano Bexiga
B52: Ponto de acupuntura 52 do meridiano Bexiga
BP6: Ponto de acupuntura 6 do meridiano Baço-Pâncreas
BPM: Batimento por minuto
C7: Ponto de acupuntura 7 do meridiano Coração
CBM: Centro Universitário Barão de Mauá.
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
Cont: Grupo controle de tratamento
CRH: Hormônio Liberador de Corticotropina
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
E36: Ponto de acupuntura 36 do meridiano Estômago
EA: Eletroacupuntura
ECG: Eletrocardiograma
EIA: Enzimaimunoensaio
EPM: Erro padrão das médias
FFT: Transformada Rápida de Fourier
GR: Receptor Glicocorticóide
HF: Frequência alta
HPA: Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
HPLC: Cromatografia líquida de alta performance
HR: Frequência Cardíaca
HRV: Variabilidade da Frequência Cardíaca
L2: Vértebra lombar 2
LF: Frequência baixa
MR: Receptor de Mineralocorticóide
MTC: Medicina Tradicional Chinesa
PC6: Ponto de acupuntura 6 do meridiano Pericárdio
PVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

Qi: Termo chinês referente a energia vital

Qi-Xue: Fluxo de energia e sangue

RIE: Radioimunoensaio

RMSSD: Raiz Quadrada da Média do Quadrado das Diferenças entre os Intervalos RR

Normais Adjacentes

RPM: Rotação por minuto

SAM: Sistema Simpato-Adrenomedular

SDNN: Desvio padrão de todos os intervalos RR normais do segmento

SDRR: Desvio padrão de todos os intervalos RR do segmento

Sham: Grupo Sham de tratamento

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

SNC: Sistema Nervoso Central

T1: Vértebra torácica 1

TENS: Estimulação Elétrica Transcutânea

UFF: Universidade Federal Fluminense

UFRRJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

VC17: Ponto de acupuntura 17 do meridiano Vaso da Conceção

VG1: Ponto de acupuntura 1 do meridiano Vaso Governador

VG5: Ponto de acupuntura 5 do meridiano Vaso Governador

VG16: Ponto de acupuntura 16 do meridiano Vaso Governador

VG20: Ponto de acupuntura 20 do meridiano Vaso Governador

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL	2
2.1 Neurobiologia do Estresse	2
2.2 Marcadores de Estresse	4
2.2.1 Cortisol	4
2.2.2 Frequência cardíaca	6
2.2.3 Variabilidade da frequência cardíaca como marcador de estresse	6
2.3 Acupuntura e Medicina Tradicional Chinesa (MTC)	10
2.4 O Cavalos e a Prática Agropecuária	13
3. CAPÍTULO I: RESPOSTAS DE ESTRESSE DE MARCAÇÃO A QUENTE VERSUS MARCAÇÃO A FRIO EM POTROS	17
3.1 Resumo	17
3.2 Abstract	18
3.3 Introdução	19
3.4 Justificativa	21
3.5 Objetivo Geral	21
3.5.1 Objetivos específicos	21
3.6 Material e Métodos	21
3.6.1 Protocolo experimental:	22
3.6.2 Frequência cardíaca e a variabilidade da frequência cardíaca	24
3.6.3 Cortisol	27
3.6.4 Análise comportamental	27
3.6.5 Análise das feridas da marcação	29
3.6.6 Análises estatística	30
3.7 Resultados	31
3.7.1 Frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca	31
3.7.2 Cortisol	33
3.7.3 Comportamento	33
3.7.4 Análise das feridas	35
3.8 Discussão	42
3.9 Conclusões	45
4. CAPÍTULO II. EFEITO DA ACUPUNTURA NAS REPOSTAS DE ESTRESSE INDUZIDAS PELO DESMAME ABRUPTO EM POTROS.	47
4.1 Resumo	47
4.2 Abstract	48
4.3 Introdução	49
4.4 Justificativa	53
4.5 Objetivo Geral	53
4.5.1 Objetivos específicos	53
4.6 Material e Métodos	54
4.6.1 Protocolo experimental :	55
4.6.2 Características do ponto de acupuntura segundo a Medicina Tradicional Chinesa (MTC)	58
4.6.3 Frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca.	61

4.6.4 Análise do comportamento	61
4.6.5 Análise do cortisol sérico e fecal.....	65
4.6.6 Estatística	65
4.7 Resultados	66
4.7.1 Frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca	66
4.7.2 Comportamento.....	69
4.7.3 Efeito entre os sexos (machos e fêmeas) na reatividade ao estresse.....	73
4.8 Discussão	74
4.9 Conclusões.....	80
5. CONCLUSÕES GERAIS	81
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXO A.....	94
ANEXO B.....	95

1. INTRODUÇÃO GERAL

Por muitos anos, o manejo dos animais de produção nas práticas agropecuárias tem se baseado nos costumes passados de gerações em gerações. Muitas destas técnicas de manejo de animais de produção invariavelmente produzem estresse e comprometem o bem-estar animal. Atualmente, tem-se buscado formas de manejos que proporcionem a manutenção do bem-estar, visando a redução dos estressores. O estresse pode afetar, negativamente, diversos sistemas fisiológicos e aumentar a incidência de doenças, dependendo da característica do estressor (intensidade e cronicidade), e da resposta adaptativa individual ao estresse. Um melhor entendimento sobre o efeito do estresse pode ajudar o desenvolvimento de estratégias para redução desses efeitos deletérios. O presente estudo teve o objetivo de avaliar, através das respostas fisiológicas e análises comportamentais, duas práticas agropecuárias muito utilizadas e de grande impacto em cavalos: a marcação e o desmame.

No primeiro capítulo foi abordada a prática de identificação através do uso da marcação permanente. No Brasil, marcar cavalos com sinais permanentes ainda é uma rotina de muitos criatórios, associações de equinos, e controle sanitário oficial. As marcações são utilizadas para proporcionar uma identificação rápida, não sendo necessária a utilização de equipamentos, como ocorre na leitura do microchip. Esta identificação tem sido feita tradicionalmente com ferro quente, por ser considerada uma técnica de baixo custo, porém muitas vezes não permite uma boa visualização, devido a formações de miíases que prejudicam a cicatrização e formação de uma marca mais nítida. Já a marcação a frio, com nitrogênio líquido, apesar de ser aparentemente mais onerosa, tem sido divulgada como um método que provoca menos dor, sem desenvolvimento de feridas, gerando uma melhor nitidez e, sendo considerado um método que reduz o estresse da marcação. Apesar desta grande relevância, poucos estudos têm avaliado os métodos de identificação animal, principalmente, na espécie equina, sendo estes em sua maioria, relacionados aos bovinos. Desta forma, este primeiro estudo propõe a avaliação da marcação a frio, com nitrogênio líquido, para reduzir os níveis de estresse na marcação de potros, a partir de cinco meses de idade.

No segundo capítulo foi analisada a prática do desmame, que representa ao potro, além da privação da mãe, mudanças na alimentação (privação do leite), alteração de ambiente e manejo. O desmame, como outros estressores, se não for bem conduzido, pode gerar queda de imunidade tornando o animal mais susceptível as doenças e infecções. Muitos estudos têm se preocupado em reduzir o estresse do desmame, sugerindo diferentes técnicas: o desmame gradual ao invés do abrupto, em piquete ao invés de baias, em grupos ou pares ao invés de individual, com a presença de uma égua adulta e/ou o uso de dietas específicas. A acupuntura tem sido muito utilizada na redução de estresse. Os estímulos gerados pela acupuntura podem ativar os centros autônomos e hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA) e desse modo, auxiliar na manutenção da homeostase e melhorar a eficiência de vários sistemas do organismo. Não há relatos, na literatura, do uso da acupuntura para auxiliar a redução no estresse do desmame em potros. Desta forma, este segundo estudo propõe o uso da acupuntura pré-desmame para reduzir os níveis de estresse no desmame dos potros, a partir de seis meses de idade.

Em ambos capítulos, os experimentos avaliaram as respostas autonômicas (frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca), endócrinas (cortisol) e comportamentais (elaboração de um etograma). E apenas no experimento do primeiro capítulo, foi avaliada a evolução da ferida e a nitidez da marcação. O presente estudo tem por finalidade avaliar os métodos de manejos e oferecer alternativas menos estressantes aos animais, visando a manutenção do bem-estar.

2. REVISÃO DE LITERATURA GERAL

2.1 Neurobiologia do Estresse

O "estresse" pode ser definido como uma resposta a vários estímulos, chamados "estressores", caracterizados pela excitação fisiológica (FOLKMAN, 2013). O mesmo estímulo pode causar " estresse bom" ou " ruim", dependendo de sua magnitude, sendo a estimulação adequada resulta no estresse bom e a insuficiente ou excessiva em "estresse ruim", (LE FEVRE et al., 2003). Portanto, é possível distinguir os fatores positivos, daqueles negativos no estresse, de acordo com seu efeito benéfico ou prejudicial à saúde, considerando a melhoria ou redução da resiliência ao estresse. Nos aspectos fisiológicos e psicológicos, as condições positivas ocorrem quando o corpo consegue manter a homeostase em resposta às demandas sofridas, porém quando a capacidade do corpo em preservar seu equilíbrio é excedida surgem as consequências deletérias do estresse (ANTONELLI; DONELLI, 2018)

Em uma situação de estresse, dois eixos neuroendócrinos são ativados: o sistema simpato-adrenomedular (SAM), que promove aumento da secreção de catecolaminas e conseqüentemente, excitação rápida do sistema cardiovascular, levando a um aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que leva a um aumento na produção de cortisol, e conseqüente mobilização de energia (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

O cérebro desencadeia respostas de estresse que são compatíveis com a natureza do estímulo. Estressores físicos, como a perda de sangue, infecção e dor exigem uma imediata reação sistêmica, que é desencadeada por mecanismos reflexos. O cérebro também responde a estressores não-físicos ou psicogênicos com base em experiência prévia ou "programas inatos". Estas respostas exigem processamento na parte frontal do cérebro e podem ocorrer em antecipação ou em reação a eventos estressantes (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Ativação SAM e do eixo HPA são sistemas primários para a manutenção e estabelecimento da homeostase. A exposição ao estressor resulta em ativação de neurônios pré-ganglionares simpáticos na coluna intermediolateral da medula espinhal toracolombar (T1 a L2). Estes neurônios pré-ganglionares se projetam para os gânglios pré e para-vertebrais que então terminam em órgãos alvo e nas células cromafins da medula da adrenal. Esta ativação simpática representa a resposta clássica de luta e fuga, que foi, primariamente, caracterizada por Cannon et al. (1929) no início do século passado e leva a um aumento dos níveis de adrenalina (proveniente da adrenal) e de noradrenalina dos terminais simpáticos, aumento da frequência e da força de contração do coração, vasoconstrição periférica e mobilização de energia. O tônus parassimpático também é mobilizado durante o estresse (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

No sistema parassimpático, a ativação de núcleos pré-ganglionares crânios-sacrais, que ativam núcleos pós-ganglionares localizados próximos aos órgãos inervados, com efeito, geralmente, oposto ao sistema simpático. Para o eixo HPA, a exposição ao estressor ativa neurônios hipofisiotróficos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) que secretam hormônios de liberação, como hormônio liberador de corticotropina (CRH) e vasopressina (AVP) na circulação porta da eminência média. Estes hormônios liberadores atuam na hipófise anterior para promover a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que atua no córtex da adrenal (zona fasciculata) para iniciar a síntese e liberação dos hormônios glicocorticóides, em cavalos o cortisol (KÖNIG; VISSER; HALL, 2017; ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Os glicocorticóides circulantes promovem a mobilização de energia estocada e potencializam numerosos efeitos simpáticos, como a vasoconstrição periférica. Além disso, o córtex da adrenal é, diretamente, inervado pelo sistema simpático, que regula a liberação de

cortisol. Então, a ativação do sistema simpático e do eixo HPA tem ações complementares no organismo, incluindo a mobilização de energia e a manutenção da pressão arterial durante o estresse (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Diversas estruturas cerebrais estão envolvidas nas respostas de estresse. Estruturas límbicas prosencefálicas, hipotálamo e o tronco encefálico recebem aferências de outras regiões e promovem a excitação ou inibição do eixo HPA e do SNA. Algumas estruturas límbicas como o hipocampo e o córtex pré-frontal possuem atividade modulatória sobre o eixo HPA, enquanto que diferentes núcleos da amígdala excitam tanto o eixo HPA como o SNA. Desta forma, a integração da atividade destas estruturas cerebrais é responsável pela modulação da magnitude da resposta de estresse. Além disso, vale ressaltar que a ativação de diferentes estruturas límbicas é responsável pela sensação de ansiedade durante uma experiência de estresse. A hiperativação da amígdala ou a hipoativação de neurônios hipocâmpais pode resultar em uma resposta de estresse exacerbada (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Estressores ativam o tronco cerebral e/ou estruturas límbicas do prosencéfalo. O tronco cerebral pode gerar respostas rápidas do eixo HPA e do SNA através de projeções diretas para os neurônios hipofisiotróficos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) ou para neurônios pré-ganglionares autônomos. Por outro lado, regiões límbicas do prosencéfalo (regulação *top-down*) não têm ligações diretas com o eixo HPA ou o SNA e, portanto, necessitam de outros neurônios antes que possam acessar os neurônios autonômicos ou neuroendócrinos. Uma alta proporção desses neurônios intermediários está localizada em núcleos hipotalâmicos que também respondem ao status homeostáticos, proporcionando um mecanismo pelo qual a informação descendente límbica pode ser modulada de acordo com o estado fisiológico do animal (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

O Cortisol, hormônio final do eixo HPA, interage com as células através da ligação a dois receptores: o receptor glicocorticóide (GR) e o receptor de mineralocorticóide (MR). O GR é encontrado na maioria dos tecidos do corpo, incluindo a maioria das áreas do cérebro. No rim e em outros tecidos do corpo, a aldosterona liga-se ao MR durante a regulação da reabsorção de sódio, mas o MR também está presente no hipocampo, onde se liga o cortisol. Estes complexos esteróide-receptores, então, interagem com o DNA, para iniciar ou para reprimir a transcrição de genes específicos, a fim de regular a síntese de proteínas que provocam alterações fisiológicas em resposta ao estresse (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

O cortisol tem dez vezes mais afinidade ao MR que ao GR. Em níveis baixos de cortisol ou situações de ausência de estresse, a maior parte do cortisol liga-se aos MRs no cérebro (principalmente, no hipocampo) e modula a atividade basal do eixo HPA e o aparecimento de resposta ao estresse. Como os níveis de cortisol mais altos, o GR se torna cada vez mais ligado, reduzindo a atividade do eixo HPA (mecanismo de *feed-back* negativo). No entanto, a ativação crônica deste receptor está ligada a vários distúrbios cognitivos relativos ao estresse (DE KLOET; OITZL; JOËLS, 1998).

Apesar das respostas de estresse serem fundamentais para a sobrevivência das espécies, a ativação constante das respostas de estresse pode produzir efeitos deletérios. Esta hiperativação pode ocorrer pela exposição repetida a situações de estresse ou a uma sensibilidade exagerada do indivíduo a situações corriqueiras, levando a uma resposta de estresse prolongada e aumentada. O prolongamento temporal da exposição ao estresse ("estresse crônico") provoca aumento considerável do tônus basal do eixo HPA, assim como aumento da reatividade ao estresse. Estas mudanças ocorrem apesar da secreção basal de glicocorticóides ser alta e cumulativa, sugerindo que existem mecanismos para contornar a inibição do *feedback* negativo, eixo HPA (AKANA et al., 1992).

O resultado final é a hipersecreção basal de glicocorticóides, hipertrofia adrenal e / ou atrofia do timo (ULRICH-LAI et al., 2006), um aumento na tônus central do eixo HPA, baixa regulação dos receptores de glicocorticóides (GR) em regiões-chave de "*feedback*" do eixo

HPA (HERMAN et al., 1995), facilitação de respostas de corticosteróides a estressores novos (AKANA et al., 1992), redução da eficácia do *feedback* negativo dos glicocorticóides (MIZOGUCHI et al., 2003); depressão e alterações comportamentais em ratos (WILLNER et al., 2005).

Todas estas sequelas podem ser associadas a mudanças nas vias centrais responsáveis pela regulação do eixo HPA, incluindo com destaque as vias que intercedem as respostas antecipatórias ao estresse, como a amígdala (hipertrofia dentrítica) e o hipocampo (atrofia dentrítica e redução da sensibilidade ao GR) (JANKORD; HERMAN, 2008).

2.2 Marcadores de Estresse

A mensuração dos níveis de estresse pode ser realizada através de parâmetros fisiológicos e comportamentais. Em equinos, as respostas de estresse são bem descritas e incluem, além da elevação do cortisol plasmático e salivar, elevadas frequências respiratórias e cardíacas (e da variabilidade da frequência cardíaca), aumento da temperatura corporal e da pressão arterial e de expressão facial típica entre muitos outros sinais comportamentais específicos (DOBROMYLSKYJ et al., 2000; RIETMANN et al., 2004a).

2.2.1 Cortisol

Uma das principais ferramentas que possibilitam a mensuração do bem-estar animal e a compreensão do comportamento é a utilização de dosagens hormonais para avaliação da presença do estresse em diferentes animais, tanto silvestres quanto domésticos (STRZELEC et al., 2011). Uma dessas substâncias é o cortisol, hormônio glicocorticóide produzido no córtex da glândula adrenal. Os estressores ativam o eixo pituitário-adrenal, levando a um aumento da produção de cortisol (RANABIR; REETU, 2011). Sua concentração é dependente do ritmo circadiano natural e pode ser alterado pelo estresse físico ou mental (STRZELEC et al., 2011). Os estímulos estressantes têm o potencial de alterar a liberação circadiana de cortisol, resultando em uma secreção modificada desse hormônio (TSIGOS et al., 2016).

A secreção de cortisol obedece a um padrão de ritmo circadiano endógeno. Nos animais de hábitos diurnos, como os equinos, as concentrações de cortisol apresentam valores mais elevados no período da manhã entre 6:00h e 10:00h, decrescendo ao longo do dia (MCCUE, 2002). As variações circadianas do cortisol podem ser afetadas por vários fatores como exercício, padrões de sono, atividade e ambientes estressantes (PELL; MC GREEVY, 1999).

As características específicas do paciente, como idade, sexo e particularidades individuais devem ser consideradas na análise do padrão diário de secreção desse hormônio (VAN CAUTER et al., 1996; SMYTH et al., 1997; HELLHAMMER et al., 2009).

Diversos métodos foram formulados para dosar os metabólitos dos glicocorticóides a partir de diferentes fluídos corpóreos como o plasma sanguíneo (método invasivo), saliva, urina, fezes e pelos (métodos não invasivos), todos mensurados por meio de técnicas como radioimunoensaio (RIE), enzaimunoensaio (EIA) e cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Cada técnica é espécie-específica, devendo ocorrer validação destes métodos para cada espécie a fim de mensurar o estresse animal (MONTEIRO, 2006).

Quando medidas fisiológicas associadas às respostas de estresse de curto prazo (agudas) são usadas para avaliar o estresse, nesses casos, alterações significativas de cortisol só podem ser obtidas do plasma/soro ou da saliva. Se o estresse for mais duradouro, longo prazo, é classificado como uma resposta de estresse mais crônica, podendo ser realizadas medidas de cortisol das fezes ou do cabelo/pelo (MÖSTL; PALME, 2002; MONTEIRO, 2006). O estresse

agudo cessa logo após o afastamento do agente estressor. Já o estresse crônico refere-se a um estado de tensão prolongado que pode levar ao desenvolvimento de várias doenças e prejuízos para a qualidade de vida (LIPP, 2006).

Embora os níveis sanguíneos ou plasmáticos de indicadores endocrinológicos de estresse possam fornecer medidas precisas de estresse, a amostragem de sangue em si pode ser percebida como um estressor e isso pode afetar os resultados de coletas posteriores. Cateterizar os animais pode ser uma solução em alguns casos para reduzir o estresse no momento da coleta de sangue. No entanto, o procedimento é caro, demorado e invasivo e, portanto, em muitas circunstâncias, não é viável. Por outro lado, medidas não invasivas, como o cortisol na saliva, na urina, nas fezes ou no cabelo, são utilizados na medida em que fornecem uma avaliação precisa dos estados de estresse. Ainda assim, para a extração da saliva, bem como da urina, há necessidade de manejo do animal, sugerindo que exista uma elevação momentânea de estresse (MÖSTL; PALME, 2002).

A detecção de níveis basais de cortisol são necessárias para avaliar as alterações nas concentrações. A ativação do HPA produz um aumento no nível de cortisol após 15 minutos do evento estressor. Os níveis de cortisol podem levar uma hora ou mais para retornar aos níveis basais, essas mudanças em relação ao momento do estressor fornece informações valiosas sobre a resposta individual (KÖNIG; VISSER; HALL, 2017).

Outro método utilizado na dosagem de metabólitos corticais é a utilização de fezes. Segundo Monteiro (2006), nas fezes, há uma grande quantidade de hormônios esteroides, dentre eles, os glicocorticóides, como o cortisol. Além disso, na amostra fecal, ao contrário da amostra sanguínea, há níveis de metabólitos hormonais de longos períodos, refletindo assim pequenas oscilações entre a dinâmica secretória normal e a resposta fisiológica. A correlação do cortisol fecal com o sérico obtém melhores resultados quando as amostras fecais são tomadas com um dia de atraso. Com isso, diversos estudos sugerem a utilização da amostragem fecal, pelo fato da não interferência como manejo de coleta. Sighieri et al. (2005) determinaram a concentração de cortisol fecal em cavalos treinados por dois diferentes métodos, encontrando que o treinamento é um momento difícil e de tensão para os animais, mesmo não existindo diferença no cortisol fecal entre os dois grupos avaliados.

Mills et al. (1997) verificaram que a inflamação crônica no equino estava associada a baixos níveis de cortisol plasmáticos, porém níveis aumentados de metabólitos de glicocorticóides foram encontrados nas fezes de cavalos que já haviam passado por uma experiência dolorosa (cólica ou castração) (MERL et al., 2000). Aumentos no cortisol salivar foram encontrados em cavalos submetidos a um procedimento potencialmente doloroso, mas esse aumento não diferiu entre os cavalos que apresentaram comportamento relacionado à esquivar/ ansiedade e os que não apresentaram (YARNELL et al., 2013), o que resulta na interpretação de que independente da origem do estresse esse marcador é ativado.

De acordo com as evidências disponíveis, os estímulos positivos reduzem a produção de cortisol em curto prazo (BERK et al., 1989), provavelmente diminuindo o efeito dos estímulos estressantes, e melhorando a resposta de liberação do cortisol, como um efeito a longo prazo (KUDIELKA; KIRSCHBAUM, 2003; SAXBE; REPETTI; NISHINA, 2008). Por outro lado, estímulos negativos são capazes de aumentar a secreção de cortisol, como um efeito de curto prazo (ASCHBACHER et al., 2013) e atenuar a resposta de liberação do cortisol (CHIDA; STEPTOE, 2009; HUBER et al. 2006; WESSA et al., 2006), excedendo a capacidade do corpo de reagir à exposição crônica a estressores (ANTONELLI; DONELLI, 2018).

As alterações no nível de cortisol são, sem dúvida, uma medida do estresse físico e da carga de trabalho, indicativas do nível de ativação e afetadas por experiências anteriores. Apesar dessas restrições, a amostragem de cortisol é um importante fornecedor de evidências fisiológicas de estresse (KÖNIG; VISSER; HALL, 2017). Para garantir que as medidas tomadas sejam significativas e representativas da resposta hormonal ao estresse, seja ela física

ou psicológica, é necessário colher amostras antes dos procedimentos de teste e repeti-las, subsequentemente, até pelo menos uma hora após o procedimento (KÖNIG; VISSER; HALL, 2017).

2.2.2 Frequência cardíaca

A frequência cardíaca é um dos parâmetros psicofisiológicos mais sensíveis que podem ser avaliados de forma não invasiva. Podendo ser uma medida relevante dos estados fisiológicos e psicológicos de um indivíduo, quando há o controle de fatores que podem influenciar a frequência cardíaca (KÖNIG; VISSER; HALL, 2017).

Os fatores que influenciam a frequência cardíaca em cavalos e humanos são fatores físicos como exercícios (estado de condicionamento, duração e intensidade do exercício), mudanças posturais, temperatura ambiente e mudanças de altitude e umidade (EVANS et al., 1977, MYRTEK, 2004). A frequência cardíaca também é um indicador sensível da excitação do sistema nervoso autônomo (MYRTEK, 2004). Portanto, fatores como emoção em si, ativação mental, estresse ou estados motivacionais como sede, fome dor, e também afetam a frequência cardíaca (CANNON, 1953).

Assim, a frequência cardíaca é um indicador da soma de desafios para um organismo, pois é um parâmetro sensível da carga de trabalho tanto física quanto psicológica (MYRTEK, 2004). Myrtek (2004) afirma que frequência cardíaca adicional (ou seja, além de situações de controle) pode ser usada como um indicador de estresse emocional.

A frequência cardíaca em repouso varia entre 25 e 60 batimentos por minuto em equinos (CLAYTON, 1991), sendo resultante de uma combinação aditiva das respectivas alterações da frequência cardíaca provocadas por uma variedade de estressores (MYRTEK; ASCHENBRENNER; BRÜGNER, 2005). Portanto, quando todos, exceto um estressor, são mantidos iguais, as diferenças na frequência cardíaca podem ser atribuídas aos níveis do estressor que esta sendo testado.

O controle do sistema cardiovascular é realizado, em parte, pelo SNA, o qual fornece terminações nervosas aferentes e eferentes ao coração, na forma de terminações simpáticas por todo o miocárdio e parassimpáticas para o nódulo sinusal, o miocárdio atrial e o nódulo atrioventricular (AUBERT; SEPS; BECKERS, 2003).

Alterações na frequência cardíaca ou pressão arterial, representando respostas autonômicas, também são, frequentemente, usadas para avaliar o estresse (KÖNIG; VISSER; HALL, 2017). Em situações estressantes, ocorre uma alteração do equilíbrio do sistema autonômico, no qual a atividade do sistema simpático domina os efeitos do componente parassimpático (BASELLI et al., 1987; KATO et al., 2003).

Mudanças rápidas na frequência cardíaca são induzidas, imediatamente pela estimulação vagal (GOLDSMITH et al., 1993) e ocorrem, tipicamente dentro de cinco segundos (HAINSWORTH, 1995), mas são de curta duração. Em contraste, a regulação pelo sistema nervoso simpático, geralmente, leva até cinco segundos para que os efeitos iniciais ocorram e as respostas máximas sejam alcançadas após 20-30 s (MALLIANI, 1995). Um aumento do componente simpático leva a secreção de adrenalina e noradrenalina, que acelera a frequência cardíaca (DEMPSEY; COOPER, 1969). A redução da frequência cardíaca, por um instante, pode ser devido ao aumento da atividade parassimpática, assim como por um decréscimo do tônus simpático, ou em muitos casos à combinação de ambos (VON BORELL et al., 2007).

2.2.3 Variabilidade da frequência cardíaca como marcador de estresse

A frequência cardíaca é o número de batimentos por minuto. A variabilidade da

frequência cardíaca (HRV) é a flutuação dentro do intervalo de tempo entre os batimentos adjacentes conforme a *Task Force da European Society of Cardiology* e da Sociedade Norte-Americana de *Pacing and Electrophysiology* (1996).

A excitação cardíaca inicia-se com um impulso gerado no nódulo sinusal, o qual é distribuído pelos átrios, resultando na despolarização atrial, que é representada no eletrocardiograma (ECG) pela onda P. Este impulso é conduzido aos ventrículos por meio do nódulo atrioventricular e é distribuído pelas fibras de Purkinje, resultando na despolarização dos ventrículos, sendo representada no ECG pelas ondas Q, R e S, formando o complexo QRS (VANDERLEI et al., 2009).

O coração não é um metrônomo e seus batimentos não possuem a regularidade de um relógio, portanto, alterações na HR, definidas como variabilidade da frequência cardíaca (HRV), são normais e esperadas, e indicam a habilidade do coração em responder aos múltiplos estímulos fisiológicos e ambientais, dentre eles: respiração, exercício físico, estresse mental, alterações hemodinâmicas e metabólicas, sono e ortostatismo, bem como em compensar desordens induzidas por doenças (AUBERT; SEPS; BECKERS, 2003; ACHARYA et al., 2006). Essa variabilidade é o resultado da oscilação rítmica dos componentes regulatórios da atividade cardíaca. Esses componentes são responsáveis pela manutenção da homeostase cardiovascular e por determinar respostas a desafios (VON BORELL et al., 2007).

O HRV primariamente, resulta da atividade dos ramos individuais do SNA, que recebe influências neuronais e humorais além de outros controles fisiológicos e mecanismos de retroalimentação (MALLIANI et al., 1995). O Sistema Nervoso Central (SNC), em particular os núcleos reticulares bulbares, o hipotálamo e as áreas neocorticais e paleocorticais, participam também na regulação da atividade cardiovascular. Sendo assim, o estímulo elétrico produzido no nódulo sinoatrial recebe influências de diversos fatores que vão resultar na variabilidade de pulsos cardíacos (VON BORELL et al., 2007).

De forma geral, a HRV descreve as oscilações dos intervalos entre batimentos cardíacos consecutivos (intervalos R-R), que estão relacionadas às influências do SNA sobre o nódulo sinusal, sendo uma medida não- invasiva, que pode ser utilizada para identificar fenômenos relacionados ao SNA em indivíduos saudáveis, atletas e portadores de doenças (AUBERT; SEPS; BECKERS, 2003; PUMPRLA et al., 2002).

A repolarização ventricular é representada pela onda T. Os índices da HRV são obtidos pela análise dos intervalos entre as ondas R, as quais podem ser captadas pelos instrumentos eletrocardiográficos, conversores analógicos ou digitais e através dos cardiofrequencímetros, a partir de sensores externos colocados em pontos específicos do corpo (VANDERLEI et al., 2009).



Figura 1: Frequencímetro Polar Equine modelo (Equine RS800cx). Ilustração do fabricante (Polar Equine®, 2011).

A HRV tem sido utilizada com sucesso, como uma medida simples e não invasiva de avaliação dos impulsos autonômicos, representando um dos mais promissores marcadores quantitativos do balanço autonômico para avaliar o estresse e o bem-estar de animais em diversas circunstâncias, e tem sido usado como um indicador de estresse agudo e crônico (VON BORELL et al., 2007). A HRV é resultado das influências antagônicas do sistema nervoso simpático e parassimpático sobre o nódulo sinoatrial. Deste modo, reflete o equilíbrio existente entre os tónus simpático e parassimpático (vagal) fornecem um indicador de comprometimento da homeostase/equilíbrio (VANDERLEI et al., 2009).

Os estados psicológicos podem ter um impacto no equilíbrio simpático-vagal na ausência de quaisquer alterações palpáveis nas frequências cardíacas e / ou respiratórias (TILLER et al., 1996). Portanto, a variabilidade da frequência cardíaca é um indicador, particularmente, bom do estresse psicofisiológico (CERUTTI et al., 1995).

Em equinos, as medições da HRV foram menores, por exemplo, durante a exposição a objetos novos (VISSER et al., 2002) ou em indivíduos mais reativos (FRIEDMAN; THAYER, 1998). A HRV pode, portanto, ser uma ferramenta útil para avaliar o estresse relacionado ao medo e à ansiedade em equinos. Devido à estreita relação entre a frequência cardíaca e a variabilidade da frequência cardíaca, os parâmetros da HRV devem ser corrigidos para diferenças no nível de atividade / frequência cardíaca quando esses fatores não podem ser controlados (KÖNIG VON BORSTEL et al., 2011).

Para análise da HRV, podem ser utilizados índices obtidos por meio de métodos lineares no domínio do tempo e no domínio da frequência e métodos não-lineares (SHAFFER; GINSBERG, 2017). No domínio do tempo, assim denominada por expressar os resultados em unidade de tempo (milissegundos), mede-se cada intervalo RR durante um determinado intervalo de tempo e, com base em métodos estatísticos ou geométricos (média, desvio padrão e índices derivados do histograma ou do mapa de coordenadas cartesianas dos intervalos RR), calculam-se os índices tradutores de flutuações na duração dos ciclos cardíacos (HOSHI, 2009).

Os índices estatísticos obtidos no domínio do tempo são (SHAFFER; GINSBERG, 2017; STUCKE; GROSSE RUS; LEBELT, 2015; VANDERLEI et al., 2009):

MEAN- Médias dos valores dos intervalos RR. Pode-se obter a $HR = (1/Mean) \times 60000$.

SDRR- Representa o desvio padrão de todos os intervalos RR gravados em um intervalo de tempo, expresso em ms.

SDNN- Representa o desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo expresso em ms, após a retirada de artefatos.

RMSSD - É a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, em um intervalo de tempo, expresso em ms.

O SDNN é influenciado por ambos sistemas nervoso simpático e parassimpático, e está, altamente, relacionado com as bandas espectrais ULV, VLF e LF. O RMSSD, é utilizado para estimar a modulação vagal cardíaca (SHAFFER; GINSBERG, 2017).

Para os parâmetros do domínio do tempo, os intervalos entre batimentos (intervalo entre dois batimentos consecutivos) são a base para a medida. O RMSSD é a medida primária do domínio do tempo usada para estimar as variações batimento a batida de alta frequência, que representam a atividade reguladora vagal (VON BORELL et al., 2007). Outra medida é o SDRR (também denominado SDNN). Enquanto o RMSSD mede a variabilidade derivada das diferenças entre os intervalos entre batimentos adjacentes, o SDRR mede a variabilidade derivada dos intervalos diretamente entre os batimentos.

Vários estudos utilizaram parâmetros no domínio do tempo para avaliar a resposta dos cavalos à exposição a um novo objeto (KÖNIG VON BORSTEL et al., 2011) ou manipulação, (VISSER et al., 2002) e diferentes métodos de treinamento (VAN BREDA, 2006; CHRISTENSEN et al., 2014). Essas situações, comumente, induzem um estado fisiológico caracterizado por um aumento na HR média e uma diminuição no RMSSD representando níveis

aumentados de estresse. Segundo Thayer et al. (1997), os cavalos mais reativos apresentavam redução no HRV.

Outro método linear é o domínio da frequência. Esta análise decompõe o HRV em potências de bandas de frequências, sendo que as principais são (SHAFFER; GINSBERG, 2017; VANDERLEI et al., 2009):

a) Potência de banda de alta frequência (*High Frequency* - HF), que corresponde à modulação respiratória e é um indicador da atuação do nervo vago sobre o coração.

b) Potência de banda de baixa frequência (*Low Frequency* - LF), decorrente da ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração, com predominância do simpático.

c) Potência de banda de muito baixa frequência (*Very Low Frequency* - VLF) e ultrabaixa frequência (*Ultra Low Frequency* - ULF) - Índices menos utilizados cuja explicação fisiológica não está bem estabelecida e parece estar relacionada ao sistema renina-angiotensina-aldosterona, à termorregulação e ao tônus vasomotor periférico.

A potência de banda de HF é um marcador da modulação vagal e está intimamente ligado à respiração conforme “*Task Force*” da Sociedade Europeia de Cardiologia e à Sociedade Norte-Americana de “*Pacing and Electrophysiology*” (1996), Enquanto a LF é por vezes considerada como principalmente simpática (CERUTTI et al., 1995), muitas vezes, são considerados os efeitos combinados da modulação parassimpática e simpática (STEIN et al., 1994). O LF / HF é, portanto, considerado um índice do equilíbrio simpático-vagal cardíaco, além de LF e HF normalizados, comumente, usados para avaliar o estresse. Com base na ligação direta com a taxa de respiração, são necessárias larguras de banda específicas para cada espécie (VON BORELL et al., 2007).

A partir dos valores obtidos de LF e HF, calcula-se a razão entre as duas potências de bandas de frequência e, assim, pode-se acessar o balanço entre a modulação simpática e parassimpática (VON BORELL et al., 2007). Desta forma, o HRV pode avaliar alterações do sistema nervoso autônomo (SNA) em diferentes níveis de excitação, sendo esta uma medida importante para quantificar o equilíbrio simpato-vagal, que permite uma avaliação mais precisa das respostas ao estresse mental durante o exercício de baixa intensidade de equinos (RIETMANN et al., 2004 a,b).

A relação LF/HF reflete as alterações absolutas e relativas entre os componentes simpático e parassimpático do SNA, caracterizando o balanço simpato-vagal sobre o coração. Para análise da HRV, séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de intervalo RR são processadas e tem seu espectro calculado pela Transformada Rápida de Fourier. Em seguida, é calculada a área abaixo da curva para obtenção da potência das bandas de LF e HF. Dados normalizados (un) da análise espectral podem ser utilizado para minimizar o efeito das alterações da banda VLF (VANDERLEI et al., 2009).

Os limites que definem as bandas de frequência variam entre as espécies. Em equinos, as variações da HR podem ser quantificadas em duas bandas de frequência principais: a de baixa (LF) e de alta (HF) frequência (STUCKE; GROSSE RUS; LEBELT, 2015).

Kuwahara et al. (1996) definiram limiares de bandas de frequência em equinos com base em estudos com bloqueio farmacológico específico do SNA e com a comparação da variabilidade relacionando a frequência respiratória e a pressão arterial. Bowen e Marr (1998) validaram esses limiares comparando diferentes índices em estudos farmacológicos adicionais. Assim, os limites de banda de frequência recomendados para análise do HRV em equinos são: LF $0,01 \geq 0,07$ Hz e HF $0,07 \geq 0,6$ Hz (KUWAHARA et al.,1996;BOWEN; MARR, 1998; STUCKE; GROSSE RUS; LEBELT, 2015).

Estudos recentes têm utilizado limiares semelhantes: LF $0,01 \geq 0,07$ Hz, HF: 0,07–0,5 (PHYSICK-SHEARD et al. 2000; MATSSURA et al., 2010; ZEBISCH et al., 2013; VILLAS-BOAS et al., 2016).

O HRV, pode ser avaliada por períodos longos de 24 horas, por períodos curtos de 5

minutos e por períodos ultracurtos de 60 a 240s (SHAFFER; GINSBERG, 2017). As análises no domínio do tempo são objetivas, mas usualmente insuficientes para informações sobre o balanço simpato-vagal (MARCHANT-FORDE, 2003), porém a razão SDNN/ RMSSD foi utilizada pelo Sollers et al. (2007) como um substituto do LF/HF, podendo representar um balanço simpato-vagal eficaz.

Existe controvérsia em relação as medições do HRV fornecerem informações válidas sob condições de exercício, especialmente quando se utiliza equipamento não baseado em ECG. Por exemplo, um estudo mostrou, em condições não estacionárias, desvios significativos dos registros de HRV pelos monitores de frequência cardíaca Polar® em comparação com os registros de ECG (PARKER et al., 2009).

Os cardiofrequencímetros são ferramentas sensíveis, porém podem ocorrer falhas na interpretação e captação dos dados. O principal erro é decorrente da interpretação equivocada de uma onda T, mais proeminente, como sendo um pico R, assim os resultados obtidos podem demonstrar um pequeno intervalo RR. Outro erro bastante comum é a criação de artefatos quando o cavalo se movimenta, havendo um descolamento entre o eletrodo e a pele do animal. Estes artefatos podem ser, facilmente, corrigidos no próprio programa Polar equine Pro Trainer5® (PARKER et al.; 2009).

Apesar das falhas citadas, o cardiofrequencímetro é uma excelente ferramenta muito utilizada para aferir o HRV, por apresentar um custo acessível e praticidade (VANDERLEI et al., 2009), tendo sido utilizado em diversos estudos.(ERBER et al., 2012 a,b.; VILLAS-BOAS et al., 2015, 2016; WULF et al., 2018).

2.3 Acupuntura e Medicina Tradicional Chinesa (MTC)

A Organização Mundial de Saúde (OMS) regulamenta a utilização de diferentes modalidades da medicina complementar, sendo uma dessas a acupuntura, uma terapia coadjuvante para o tratamento de várias doenças, e o seu uso vem se tornando cada vez mais popular em países do ocidente (ZHAO, 2008; ZHANG et al., 2013).

A acupuntura vem sendo utilizada, amplamente, em casos de alterações comportamentais e físicas decorrentes do estresse em humanos e em animais. Além disso, a técnica possui a vantagem de não produzir os efeitos colaterais observados no tratamento convencional, e baseia-se no restabelecer do equilíbrio, por isso, é muito importante, o seu uso além do terapêutico, mas, também, como forma de prevenção de doenças.

Na medicina chinesa, a prevenção de doenças tem sido enfatizada, e a idéia e princípio de "preveni-los antes que ocorram" foram enfatizados. No Huang Di Nei Jing (Clássico do Imperador Amarelo), foi estabelecido o sistema ideológico de "tratamento de condições subclínicas". A partir da perspectiva de prevenção, de modo a alcançar saúde plena e longevidade, sendo a parte mais importante da medicina chinesa, esta estabelecidas pelas bases da fitoterapia e acupuntura para prevenção e tratamento de doenças (JIE, 2010).

Baseado no contexto histórico, a acupuntura é uma das terapias da Medicina Tradicional Chinesa, no qual existem relatos do seu uso prático há pelo menos cinco mil anos no continente asiático, mais especificamente na China (SCOGNAMILLO-SZABÓ et al., 2006; ZHAO, 2008).

A história da acupuntura veterinária está envolta por lendas antigas sobre o Imperador *Fusi*, que uniu as sociedades primitivas, formando a civilização chinesa. Isso teria ocorrido há cerca de 10.000 anos, no período de domesticação de animais que incluía atividades como o tratamento dos doentes. A importância destes na sociedade agrária é indiscutível e ganhou mais destaque no Período das Guerras durante a Dinastia Chou (475 AC a 221 AC) quando os exércitos necessitavam de médicos para seus cavalos (LIN et al., 2003). Um registro histórico

marcante é a escultura em rocha da Dinastia Han (206 AC a 220 DC) que mostra soldados fazendo acupuntura com flechas em seus cavalos para estimulá-los antes das batalhas (KIM et al., 2005; PITTLER;ERNST, 2006; SCHOEN, 2006; XIE; PREAST, 2013).

A prática da acupuntura veterinária no Brasil é recente, com o primeiro registro datado em 1981 e descreve o uso da eletroacupuntura analgésica em cirurgias abdominais em cães. Mas, antes disso, em 1978, o Professor Paulo Iamaguti da FMVZ, UNESP, Botucatu, já utilizava a técnica em partos distócicos e cirurgias de piometra em cadelas. Um dos principais incentivadores do estudo da acupuntura veterinária no Brasil foi o Professor Tetsuo Inada, no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em meados da década 1980. Nesse período, a escassez de literatura fazia com que o “Mestre Tetsuo” ensinasse por transposição, utilizando mapas para humanos. Muitos alunos do “Mestre Tetsuo”, a exemplo da Professora Magda Alves Medeiros, iniciaram a prática clínica da acupuntura em animais. Apesar da acupuntura veterinária ser, razoavelmente, difundida no Brasil, só foi reconhecida como especialidade médica veterinária em 2014, conforme a resolução CFMV nº 1051, de 14 de fevereiro de 2014 (SCOGNAMILLO-SZABÓ et al., 2006; GODOI et al., 2016).

O termo acupuntura é derivado dos radicais latinos "acus e pungere", que significa agulha e punção. A acupuntura pode ser definida como a inserção de agulhas em pontos específicos no organismo para gerar um efeito terapêutico ou homeostático (XIE; PREAST, 2013). Na MTC, a acupuntura inclui o uso de agulhas finas (agulhas secas), hemopuntura, moxabustão, pneumoacupuntura, aquapuntura, eletroacupuntura, acupressão, aquecimento, entre outros (XIE; PREAST, 2013).

Na medicina ocidental contemporânea, a acupuntura é considerada uma forma de estimulação sensorial que afeta várias classes de fibras nervosas aferentes, e uma vez direcionada para a medula espinhal e os centros superiores do SNC, desencadeia os eventos neurofisiológicos que geram a resultado terapêutico (SOLIGO et al., 2013).

O ponto de acupuntura, conhecido como acuponto, é definido, geralmente, como um ponto da pele com sensibilidade espontânea ao estímulo, caracterizado por resistência elétrica reduzida (HWANG; EGERBACHER, 2001). Muitos acupontos estão situados em depressões superficiais nas junções musculares e são áreas cutâneas providas de concentrações altas de terminações nervosas livres, plexos nervosos, mastócitos, vasos linfáticos, arteríolas e vênulas (HARMAN, 1993; LUNA; TAYLOR, 1998).

Os estímulos gerados pela acupuntura podem ativar os centros autônomos e o eixo HPA e, desse modo, auxiliar na manutenção homeostase e melhorar a eficiência de vários sistemas do organismo (LI et al, 2013).

Portanto, muitos dos conceitos preconizados pela MTC passaram a ter um fundamento científico, e através de pesquisas neurofisiológicas, tem-se explicado muitos dos efeitos da acupuntura, por meio da teoria neural não opióide, teoria humoral, da bioeletricidade e relações somatoviscerais (HARMAN, 1993, SHOEN, 2006). A teoria neural não opióide implica na inibição de impulsos conduzidos por fibras nervosas, sendo que o efeito da acupuntura depende dos sistemas nervosos periférico e central. Já a teoria humoral é baseada na evidência de que a acupuntura estimula a liberação de opióides endógenos. Este mecanismo age em vários locais do sistema nervoso central, inibindo a percepção dolorosa e a transmissão da dor da medula espinhal por meio de inibição descendente (SHOEN, 2006).

Dessa forma, em termos fisiológicos, a acupuntura procura restabelecer o equilíbrio entre estados contraditórios de função e a homeostase. Sob a ótica da MTC, isso ocorre porque a acupuntura alterna os estados de energia e, com isto mantém a organização ideal do órgão e do organismo a ser tratado (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1997).

A teoria geral da acupuntura é baseada na premissa de que há um padrão de fluxo de energia e sangue (chamada "Qi-Xue") através do corpo, essenciais para uma saúde perfeita e que quando ocorre a estagnação do fluxo de sangue e energia, as enfermidades acontecem

(SCOGNAMILLO-SZABÓ et al., 2006; ZHAO, 2008; ZHANG et al., 2016).

Pela MTC, a energia flui através do organismo ao longo dos canais específicos ou meridianos. Estes meridianos fazem a comunicação entre órgãos e extremidades e, através deles que as funções fisiológicas do organismo são reguladas e o equilíbrio é mantido. Existem 14 meridianos principais, sendo 12 deles bilaterais e correspondentes a cada órgão Zang-Fu, e outros dois que circulam nas linhas médias dorsal e ventral. Ao longo da cada meridiano existem pontos específicos onde as agulhas de acupuntura são inseridas (MACIOCIA, 2007; SCOGNAMILLO-SZABÓ et al., 2006; ZHAO, 2008; ZHANG et al., 2013). O sistema de meridianos é utilizado para fazer diagnóstico e desenvolver planos de tratamentos para ampla variedade de condições patológicas. Os demais fatores, como Yin Yang, energia, sangue e órgãos Zang Fu, devem estar em equilíbrio para que haja saúde. O organismo deve também manter o equilíbrio com o ambiente externo (CAIN, 2003).

Diversas evidências experimentais demonstram que a estimulação de pontos de acupuntura pode promover a liberação de diferentes neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC) (HAN 2003), e levando efeitos fisiológicos que podem ativar mecanismos de auto-cura (BAI; LAO 2013). Diferentes mecanismos neurobiológicos têm sido propostos para os efeitos analgésicos (HAN 2003), anti-inflamatórios (MCDONALD et al. 2015) e anti-estresse (ESHKEVARI et al. 2013, KONDO; KAWAMOTO, 2014) da acupuntura.

Outros comprovam a eficácia dessa terapia também como tranquilizante e anti-estresse em equinos (LUNA et al., 2008; GODOI et al., 2014; VILLAS-BOAS et al., 2016; RIZZO et al., 2017).

Estudos revelaram que nas regiões onde os acupontos estão localizados existem altas concentrações de terminações aferentes de fibras $A\alpha$, β , δ e C (respectivamente, os grupos de fibras I, II, III e IV) e que, quando estimuladas, podem estimular, diretamente, o SNC e induzirem diferentes respostas fisiológicas, como a analgesia, a liberação de endorfinas, a redução da resposta imune, a alteração na resposta autonômica, a liberação de fatores neurotróficos, entre outros (ZHAO, 2008; JIANG *et al.*, 2014).

Existem formas diferentes de estimulação dos acupontos, determinando a modalidade de acupuntura empregada na prática clínica. As modalidades da MTC mais difundidas são a acupuntura manual, eletroacupuntura, moxabustão, fármaco-acupuntura (CAI *et al.*, 2015; KHALIL *et al.*, 2015).

Na acupuntura manual, os acupontos na pele e/ou no músculo são estimulados por movimentos rotacionais da agulha (ZHAO, 2008).

A acupuntura é conhecida por ser capaz de regular a função autonômica (LI et al., 2013; VOGEL et al., 2005). Estudos utilizando a análise da HRV em humanos mostraram que a acupuntura diminui a razão LF / HF diminuindo o LF e / ou aumentando o HF em indivíduos saudáveis (WANG; KUO; YANG, 2002), em enfermeiras que trabalham à noite (HWANG, et al. 2011) e em indivíduos cansados (LI et al., 2005). O tratamento com acupuntura foi capaz de reduzir a razão LF / HF em pacientes hipertensos, e embora nenhuma medida de cortisol tenha sido realizada, esta redução foi relacionada a uma diminuição no estresse durante o período de tratamento (SPARROW; GOLIANU, 2014).

Com base nisso, a acupuntura tem sido proposta para o tratamento de doenças relacionadas ao SNA, modulando o equilíbrio entre os ramos simpático e parassimpático (LI et al., 2013). Em equinos, a sessão de 20 minutos de acupuntura nos acupontos VG1, C7, VG20 e B52, imediatamente antes do teste de sobressalto (abertura do guarda-chuva) modificou o equilíbrio simpático-vagal com a modulação parassimpática, reduzindo o aumento induzido em LF / HF após o sobressalto (VILLAS-BOAS et al., 2015).

Em cães, um estudo preliminar sobre os efeitos de estimulação do acuponto PC6 (*Neiguan*) sobre a HRV durante condições estáveis, mostrou que a acupuntura pode mediar as alterações da HRV mesmo após o bloqueio farmacêutico da função autonômica (WANG et al,

2013). Os autores sugeriram que os efeitos da acupuntura na HRV devem se basear não apenas no sistema nervoso autônomo, mas em todo o sistema nervoso central (WANG et al, 2013). Para estudar os efeitos da estimulação da eletro-acupuntura (EA- aplicação de corrente elétrica pulsátil entre pares de agulhas de acupuntura) no sistema nervoso autônomo em cães, Kimura et al. (2008) submetem os cães da raça Beagle à estimulação EA nos pontos VG5 e VG20 e avaliaram a HRV. A estimulação de EA aumentou a razão LF / HF em diferentes momentos do dia, sem efeito sobre a HR e no HF, sugerindo que a EA aumenta a modulação simpática cardíaca em cães (KIMURA e HARA, 2008).

Maccariello et al. (2018) demonstraram que o efeito de uma simples sessão de acupuntura, nos pontos Yin Tang, VG 20, C7, PC6 e E36, reduziram o valor da razão LF / HF em animais submetidos a um modelo de estresse agudo acústico.

O efeito da acupuntura foi avaliado em experimentos com estresse agudo por contenção. Guimarães et al. (1997) avaliaram o efeito da acupuntura nos acupontos BP6, E36, VC17, PC6, VG20 durante um período de imobilização de 60 minutos em ratos *Wistar*, utilizando como parâmetros cardiovasculares, a pressão arterial, e a frequência cardíaca afim de realizarem uma análise de comportamento. Os resultados obtidos sugerem que a acupuntura aplicada durante o estresse agudo por contenção atenua alguns comportamentos envolvidos na reação de luta ou fuga característica do estresse, de maneira independente dos parâmetros cardiovasculares avaliados.

Godoi et al. (2014), avaliaram uma forma de redução do estresse no transporte de equinos, associando o ponto da acupuntura VG1 com 1/10 da dose de acepromazina, aplicada imediatamente antes do embarque e esta foi capaz de diminuir o aumento da HR, induzido pelo estresse.

2.4 O Cavalo e a Prática Agropecuária

O cavalo é um animal versátil e, em todo Brasil, existem diferentes modalidades equestres, como alguns esportes mais clássicos, como salto e adestramento, e outros mais regionais, como a vaquejada e tambores. Também existe o uso militar, praticado em diferentes estados do país, usos agropecuários e de trabalho (LIMA; SHIROTA; BARROS, 2006).

O Brasil possui o 4º maior rebanho de cavalos do mundo, com, aproximadamente, 5,3 milhões de cabeças. Os Estados Unidos é o país com maior rebanho, com, aproximadamente, 10,3 milhões de cabeças, seguido por México, com 6,35 milhões e China, com 6,33 milhões (FAO, 2015). A tropa nacional é superior a 5 milhões de cavalos, divididos em cavalos trabalho, lazer e competição. Apesar da incorporação de máquinas de última geração e de ferramentas tecnológicas, o cavalo continua sendo decisivo para o desenvolvimento de atividades pecuárias e agrícolas na grande maioria das propriedades produtivas nacionais. A equinocultura, como um seguimento do agronegócio, é confirmada pelos números expressivos R\$ 16,15 bilhões movimentados por ano, gerando 610 mil empregos diretos e 2.430 mil empregos indiretos, sendo responsável, assim, por 3 milhões de postos de trabalho (MAPA, 2016).

Cavalos são animais sociais, vivem em grupos (MILLS; NANKERVIS, 2005), e possuem comportamento de presa na natureza. Sobrevive fugindo de predadores e adota o comportamento de “fuga ou luta”, ou seja, o cavalo pode então fugir de uma suposta ameaça ou achar que a melhor opção naquele momento é lutar (GOODWIN, 2002). Deve-se, sempre, permitir o contato social com diferentes equinos, pois os animais mais jovens aprendem com os outros e, assim, podem ter experiências variadas, ajudados em seus aprendizados (KILEY-WORTHINGTON, 2011).

Quem convive com cavalos percebe, facilmente, que eles preferem situações que lhes tragam prazer e evitam situações que lhes causem medo e sofrimento (DUNCAN e

PETHERICK, 1991; BROOM; MOLENTO, 2004). É comprovado cientificamente que os animais são seres sencientes e possuem a capacidade de experimentar sentimentos bons e ruins.

A senciência é a capacidade que um indivíduo tem de sentir conscientemente algo, ou seja, de estar consciente do que acontece ao seu redor (MOLENTO, 2006).

Senciência animal constitui o fundamento da ciência do bem-estar animal (PROCTOR; CARDER; CORNISH, 2013). Compreender como os animais podem sofrer, as práticas que os afetam e como eles experimentam as emoções é fundamental para melhorar o seu bem-estar (PROCTOR, 2012).

Segundo Broom (1986), o bem-estar de um indivíduo é o estado deste em relação às suas tentativas de adaptação ao seu ambiente.

O momento para a avaliação do bem-estar deve ser considerado frente às diversas situações ocorridas durante a rotina diária, procedimentos regulares ou esporádicos e de acordo com os diferentes sistemas de criação.

Situações ruins duradouras e frequentes são piores para o grau de bem-estar do cavalo. Algumas situações são previstas na vida de um cavalo mantido pelo ser humano, como o confinamento, o desmame, a doma, a castração e a marcação; porém, as boas práticas minimizam seus efeitos negativos para o cavalo e suas consequências na rotina diária (GRANDIN e JOHNSON, 2010).

Quanto ao manejo de éguas prenhes, estas devem parir em local seguro e depois devem ser mantidas com seus potros, e manejadas de forma que seus potros não corram riscos. Mães e potros devem sempre ficar juntos até o desmame, ambos inseridos em um grupo com outras éguas e seus potros (MAPA, 2017).

A fase de amamentação dos potros é de 180 dias, e pode variar em função do manejo do rebanho. É uma das mais importantes fases na vida do animal, a taxa de crescimento é acelerada e as exigências nutricionais são mais elevadas (CUNHA, 1991)

Segundo Saastamoinen (1996), o crescimento de potros durante o primeiro ano é rápido, até os doze meses de idade, ele alcançará 65% do peso definitivo e cerca de 90% da altura dos animais adultos. Cada estágio na vida dos cavalos tem seu requerimento nutricional a ser observado. O primeiro ano de vida é especialmente importante, devido ao crescimento rápido do animal, que diminui nos anos subsequentes. Deve-se destacar que a formulação de uma dieta deve levar em consideração o metabolismo basal do cavalo e fornecer nutrientes suficientes para crescimento adequado, o que resulta em constantes mudanças à dieta para suprir os requerimentos do animal em determinada época.

A produção de leite das éguas é crescente até atingir o pico, antes do segundo mês de lactação, e decresce constantemente até o final do período de lactação (OFTEDAL et al., 1983; CABRERA et al., 1990; DOREAU et al., 1990; GIBBS et al., 1982, SANTOS et al., 2005). Santos et al. (2005) avaliaram a produção de leite das éguas Mangalarga Marchador, e concluíram que a produção segue o mesmo padrão das demais raças da espécie equina.

O leite de éguas é pobre em energia (425 a 825 kcal/kg), em gordura (1,0 a 1,5%) e em proteína bruta (1,89 a 2,87%), mas rico em lactose (6,5 a 6,6%) (PAGAN; HINTZ, 1988; GIBBS et al., 1982), quando comparado ao leite das demais espécies domésticas. A concentração dos diversos constituintes do leite decresce desde o início do período de lactação, com exceção da lactose, que segue a curva já descrita. Segundo Doreau et al. (1991), lactose é um fator controlador da pressão osmótica dentro do úbere, o que favorece o enchimento do mesmo.

No período final da lactação, quarto mês em diante, a produção leiteira sofre redução para quase metade dos níveis do início da lactação e o potro já está se alimentando de capim ou feno, suprimindo parte de suas necessidades nutricionais. Com a suplementação de concentrado e volumoso adequada, o potro já pode ser desmamado sem prejuízo para seu crescimento e desenvolvimento. O critério ideal para definir o momento do desmame deve ser o tamanho do

potro, se o mesmo tiver que dobrar, acentuadamente, os membros anteriores para mamar, é sinal de que ele pode ser desmamado, a fim de evitar a possibilidade de desvios nos aprumos.

A dieta do cavalo em crescimento é constituída primariamente de colostro, leite, água, forragem e concentrados (GEOR et al.,2013). Nas primeiras semanas, o colostro e o leite são os principais fatores na dieta a fornecer nutrientes suficientes, a população microbiana do trato gastrointestinal somente digere fibras eficientemente a partir do segundo mês de vida do potro (FAUBLADIER et al.,2013).

A qualidade do leite no fim da lactação é mais pobre do que no início da lactação, devido ao fato de que o potro já se alimentar de forragem, portanto o leite não é mais essencial para manter sua sobrevivência (SANTOS et al.2005).

Potros devem ser desmamados em grupo. Preferencialmente permanecendo juntos a cavalos adultos que lhes são conhecidos, que são calmos e tranquilos. Estes adultos servirão de “padrinhos”, auxiliando no aprendizado e passando segurança aos potros. Este tipo de manejo aumenta o grau de bem-estar dos potros (MAPA, 2017).

A partir dos 6 meses, o potro já estará relativamente independente da mãe e terá seu sistema imune competente, evitando que o período de estresse desencadeie uma susceptibilidade à doença. O potro também já não estará tão dependente do leite, sendo capaz de se alimentar de forrageiras sem prejuízos nutricionais (MAPA, 2017).

CAPÍTULO I:

Respostas de estresse de marcação a quente *versus* marcação a frio em potros.

3. CAPÍTULO I: RESPOSTAS DE ESTRESSE DE MARCAÇÃO A QUENTE *VERSUS* MARCAÇÃO A FRIO EM POTROS

3.1 Resumo

Marcar cavalos com sinais permanentes, ainda é uma rotina de muitos criatórios e associações no Brasil. Estas marcações são utilizadas com a finalidade de identificação, seja da propriedade, da associação na qual pertença o animal, em programas de melhoramento genético, em controle de doenças, ou por outros propósitos. Essa identificação é feita tradicionalmente com ferro quente, porém tem sido amplamente divulgada a marcação a frio com nitrogênio líquido, como método menos doloroso e que consequentemente colabore com o bem-estar do animal. O objetivo do presente estudo foi comparar os níveis de estresse e qualidade da marcação em potros marcados a ferro quente e a frio, com nitrogênio líquido. Foram avaliados os parâmetros fisiológicos autonômicos (variabilidade da frequência cardíaca (HRV)), endócrinos (cortisol sérico), comportamentais e a avaliação da nitidez da marcação, antes, durante e após a marcação com ferro candente e com nitrogênio líquido. Dados do HRV foram adquiridos utilizando o frequencímetro cardíaco Polar Equine®, as amostras de sangue foram coletadas diretamente da veia jugular, com agulha e tubo a vácuo sem anticoagulante, no período de 30 minutos antes, 30 e 60 minutos após a marcação. O comportamento no momento da marcação foi filmado para posterior análise por um etograma, e foram realizadas fotografias das marcas para análise da nitidez. Foram utilizados 23 potros da raça mangalarga marchador (M.M.) e mestiços de M. M., provenientes da fazenda da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que em sua rotina seriam marcados para identificação do criatório com o símbolo 47 (6,5X8,5 cm). Os animais foram divididos em dois grupos experimentais: grupo fogo (n=11) e grupo nitrogênio (n=12). Na análise do HRV, observou-se no momento da marcação, no grupo fogo, um aumento significativo dos valores: da frequência cardíaca (HR), da potência de banda de baixa frequência (LF), da razão LF/HF, do desvio padrão de todos os intervalos RR normais (SDNN) e diminuição da potência de banda de alta frequência (HF) sugerindo ativação autonômica de predomínio simpático sobre o parassimpático, representando maior nível de estresse no grupo fogo em comparação ao nitrogênio. O cortisol não foi um parâmetro suficiente para indicar estresse durante o procedimento das marcações, pois o estímulo não promoveu um aumento significativo. Quanto a avaliação comportamental, no grupo fogo, foram notados intensos movimentos dos membros. Na análise da reatividade a dor foi observado, no grupo fogo, reações mais intensas de fuga, com presença de coices e empinar, porém não foi obtido diferença significativa entre os grupos. Na marcação a fogo houve o desenvolvimento de feridas abertas e necrose no local da marcação, sendo as feridas do grupo nitrogênio superficiais e não ocorrendo necrose. Quanto a análise da nitidez, não foram obtidas diferenças significativas em ambos os grupos. O nitrogênio apresentou ser uma melhor opção para realização da marcação por proporcionar menores respostas de estresse, com diminuição dos índices de HR, LF, LF/HF, SDNN e por não apresentar a formação de feridas abertas, obtendo a mesma nitidez da marcação a fogo. Em suma, o estudo mostra que pequenas modificações no manejo, podem proporcionar uma grande melhora no bem-estar animal.

Palavras-chaves: bem-estar animal, cavalo, variabilidade da frequência cardíaca.

3. CHAPTER I. STRESS RESPONSES OF HOT IRON BRANDING VERSUS FREEZE BRANDING IN FOALS

3.2 Abstract

Branding horses with permanent signs, is still a routine of many breeding farms and associations in Brazil. These markings are used for the purpose of identification, to determine the property or the association in which the animal belongs, in breeding programs, in disease control, or for other purposes. This identification is traditionally made with hot iron, but the cold marking with liquid nitrogen has been disseminated as a less painful method and consequently collaborates with animal welfare. The objective of the present study was to compare stress levels and marking quality in hot and cold-marked colts with liquid nitrogen. The autonomic physiological parameters (heart rate variability (HRV), endocrine (serum cortisol), behavioral and the evaluation of marking clarity, before, during and after marking with burning iron and with liquid nitrogen were evaluated. HRV data were acquired using the Polar Equine® heart rate monitor, blood samples were collected directly from the jugular vein, with needle and vacuum tube without anticoagulant, within 30 minutes before, 30 and 60 minutes after branding. The behavior at the moment of marking was filmed for later analysis by an etogram, and photographs were taken of the marks for analysis of sharpness. **METHODS:** Twenty - three young horses from the Federal Rural University of Rio de Janeiro farm were used to identify the owner with the symbol 47 (6.5 x 8.5 cm) . The animals were divided into two experimental groups: fire group (n = 11) and nitrogen group (n = 12). In the HRV analysis, a significant increase in heart rate (HR), low frequency band (LF), LF / HF ratio, standard deviation of all normal RR intervals (SDNN) and decrease of the high frequency band (HF) power suggesting autonomic activation of sympathetic predominance over the parasympathetic one, representing a higher level of stress in the fire group compared to nitrogen. Cortisol was not a sufficient parameter to indicate stress during the marking procedure, since the stimulus did not promote a significant increase. Regarding the behavioral evaluation, in the fire group, intense movements of the limbs were noticed. In the reactivity analysis the pain was observed in the fire group, more intense reactions of leakage, with presence of kicks and cramps, but no significant difference between groups was observed. In the fire marking there was the development of open wounds and necrosis at the marking site, the wounds of the nitrogen group being superficial and no necrosis occurring. Regarding the analysis of the sharpness, no significant differences were obtained in both groups. Nitrogen was a better option to perform the branding because it provided lower stress responses, with a decrease in HR, LF, LF / HF, SDNN, and because of the absence of open wound formation, obtaining the same sharpness of fire marking in short, the study shows that small changes in the management, can provide a great improvement in animal welfare.

Key words: horse, animal welfare, heart rate variability.

3.3 Introdução

Os animais de produção foram marcados com ferro quente por milênios de anos. Originalmente, o objetivo da marcação era, simplesmente, identificar a propriedade na qual o animal pertencia, utilizando assim o ferro quente para promover uma marca permanente no animal. Mais tarde, tornou-se uma maneira de marcar a raça de um animal e um meio de identificar os animais, individualmente, de forma confiável (LINDEGAARD; ANDERSEN, 2012).

Em alguns países da Europa, como Escócia e Dinamarca, a marcação a quente foi proibida, porém permanece amplamente utilizada em diversos países (LINDEGAARD; ANDERSEN, 2012). No Brasil, a marcação com ferro quente ainda é permitida e até mesmo obrigatória em alguns casos de sanidade animal e por associações dos criadores de raças.

Conforme a lei nº11.794, o ato de identificar um animal, seja por tatuagem, introdução de brincos ou marcação com ferro, é considerado uma prática de manejo, sendo conferidos a estes procedimentos apenas dor ou aflição momentânea ou dano passageiro (BRASIL, 2008).

O regulamento técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal - PNCEBT, em bovinos e bubalinos, instituído em 2001, recentemente, foi revisto pela Instrução Normativa SDA nº 10, de 3/03/2017. No programa, os animais vacinados e os animais positivos eram, obrigatoriamente, marcados com ferro candente, porém, com a crescente preocupação em proporcionar bem-estar aos animais, houve mudanças na legislação e foi permitido também o uso do nitrogênio líquido para realização da marcação (BRASIL, 2017). No programa de sanidade Equídea, no caso de animais positivos para Anemia Infecciosa Equina, ainda é obrigatória a identificação com ferro candente com a letra “A” circunscrita, no caso destes não serem imediatamente, sacrificados (BRASIL, 2004).

Identificar animais de produção é uma prática agropecuária muito importante, sendo necessário que esta identificação seja de fácil visualização, individualizada, de fácil aplicação, preferencialmente, acessível a todos (AURICH et al., 2013). A identificação deverá gerar o mínimo de dor e desconforto ao animal, preservando o bem-estar. Apesar desta grande relevância, poucos estudos têm avaliados os métodos de identificação animal, principalmente, na espécie equina, sendo estes em sua maioria, relacionados aos bovinos (LINDEGAARD; ANDERSEN, 2012).

Nos estudos envolvendo marcação na espécie bovina, foram comparados os métodos de marcação a ferro candente (marcação a fogo) com a marcação a nitrogênio, comparando também a marcação falsa (marcação com ferro a temperatura ambiente), podendo concluir que a marcação a fogo é, substancialmente, mais dolorosa e induz mais inflamação que a marcação a nitrogênio líquido ou marcação falsa (LAY et al., 1992a, 1992b, 1992c, SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 1997, 1998; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN; STOOKEY, 1997; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN; STOOKEY; WELFORD, 1997).

Nos estudos envolvendo marcação na espécie equina foram avaliados os métodos de marcação a fogo comparados com a introdução de microchip (ERBER et al., 2012b; LINDEGAARD et al., 2009; POLLMANN, 1998) não havendo estudos comparativos da marcação a fogo, com a marcação a nitrogênio líquido em equinos.

O ato de marcar um animal a fogo, consiste em colocar um ferro de coloração rubro clara, previamente, aquecido até temperatura de 500°C, na pele do animal por até 5 a 6 segundos a fim de gerar uma queimadura e uma cicatriz na qual o pelo irá crescer num padrão diferente dos pelos adjacentes (CAJA et al., 2004).

Aurich et al. (2013), avaliaram 248 cavalos e concluíram que a marcação utilizando ferro quente provoca feridas compatíveis com lesão térmica de terceiro grau, mas nem sempre permite a identificação de cavalos.

O uso do nitrogênio como método de marcação não é tão antigo como a marcação a

quente, e seus primeiros relatos datam do século XX. Em 1966, Farrell apud (MACPHERSON; PENNER, 1967) publicou um experimento sobre a técnica de marcas a frio em bovinos. Em 1967, Macpherson e Penner estudaram a identificação por nitrogênio em bovinos, concluindo que os ferros devem ter 14 milímetros de largura e 25 milímetros de espessura para gerar uma boa marcação. Em 1992, é lançado um manual técnico orientando a utilização do nitrogênio em equinos (HOUSEHOLDER et al, 1992), e em 1993, Householder et al., avaliaram um aerossol para utilização prévia antes da marcação com nitrogênio em cavalos, com objetivo de melhorar a nitidez e a aceitabilidade da marcação.

Nos últimos anos, a marcação com nitrogênio líquido tornou-se, extremamente, popular, por ser um método seguro, econômico e de simples execução. A marca a frio pode ser feita em cavalos de qualquer idade. Parece ser, relativamente, indolor e não gera feridas abertas, não danificando a pele do animal. A marca é legível, permanente e, facilmente, visualizada durante todo o ano (HOUSEHOLDER et al, 1992).

Para realização do ato de marcação com nitrogênio líquido, o animal deve estar bem contido, e não pode se mover. O marcador é resfriado num isopor com nitrogênio líquido até que o mesmo cesse de borbulhar. Dessa forma, o marcador é aplicado na pele do animal, previamente tricotomizada, limpa (com solução alcoólica 96%) e seca.

Os tempos de permanência da marca na pele do animal variam de acordo com o tipo de liga metálica que compõe o ferro de marcar, a idade do animal (espessura da pele) e cor do cavalo. É importante, durante a marcação, cronometrar o tempo de permanência do ferro, bem como manter uma pressão constante da marca sobre a pele do animal.

Pode-se utilizar os marcadores de liga férrea, geralmente, empregados em marcação a fogo, porém estes não retêm, suficientemente o frio e assim requerem um maior tempo de permanência na pele para gerar os mesmos resultados de ferros projetados especificamente para marcação a nitrogênio líquido, como o aço inox. O tempo de permanência do ferro na pele do potro é de 8 ou 45 segundos em animais de pelagem escura e 12 ou 50-60 segundos na pelagem clara, utilizando os ferros de aço inox e liga férrea respectivamente, atingindo uma temperatura -170 a -197°C (HOUSEHOLDER et. al 1992; CAJA et al., 2004).

Quando o ferro congelado pelo nitrogênio é colocado sobre a pele, a temperatura fria destrói os melanócitos responsáveis pela coloração do pelo. Contudo, o pelo continua a crescer a partir do folículo responsável pelo crescimento. Como resultado, no local da marcação haverá o crescimento de pelos sem pigmentos, o que resultará na aparência de pelos brancos, resultado desejado em animais de pelagem escura. Porém, se o ferro for pressionado contra a pele por um período mais curto de tempo e / ou com uma pressão menor do que necessário, alguns pelos permanecerão com a coloração original e outros crescerão brancos, conferindo a uma aparência listrada. Se o ferro permanecer na pele do animal por um maior período de tempo, irá ocorrer lesão de matriz extracelular, pois a temperatura fria destruirá a base do folículo piloso, que contém a raiz germinativa, responsável pelo crescimento do pelo, fazendo com que nenhum cabelo cresça naquele local, sendo desejável em animais de pelos claros e pele escura, na qual a marcação com pelos brancos não seria bem visualizada. Assim, no local da marcação o pelo não cresce, a marca apresentará uma visualização escura, devido à ausência de pelos, e a pele do animal será exposta (HOUSEHOLDER et. al 1992; CAJA et al., 2004).

Atualmente, existem diversos estudos que avaliam as condições do bem-estar animal, contudo, a marcação permanente em animais de produção ainda é muito utilizada na prática agropecuária, e gera diversas polêmicas quanto a manutenção do bem-estar animal, porém este tipo de identificação ainda é necessário e previsto na legislação brasileira vigente.

A fim de melhorar as condições de bem-estar e minimizar o efeito do estresse da marcação em potros, foram comparadas as marcações a quente, com ferro candente, e as marcações a frio, com nitrogênio líquido, analisando as variáveis fisiológicas através da Frequência Cardíaca, Variabilidade da Frequência Cardíaca, do Cortisol Sérico, estudando também a nitidez da

marcação na pele através da fotografia da região após marcação.

Assim, análise dos métodos de identificação visa contribuir para a escolha acertada de identificação de potros, de forma a minimizar o estresse na marcação aumentando as chances de melhor sociabilização deste com o ser humano.

3.4 Justificativa

As marcações dos potros da UFRRJ eram feitas apenas com ferro candente, configurando a marcação a quente. O ato de marcar a quente o animal ainda gera polêmicas, mas é necessário a identificação inclusive dentro da própria Universidade. A guarda da Universidade ao avistar um animal com a marca “47”, deverá, imediatamente, avisar ao setor de equinos, e este realizará o recolhimento do animal. Caso o animal não esteja marcado, este animal poderá ser levado pela Apreensão Federal, se o mesmo estiver solto dentro do Campus. Assim sendo, a identificação rápida, acessível a todos e de fácil visualização é essencial.

Apesar da marcação gerar um estresse de curta duração, este é de grande intensidade e pode traumatizar o potro, gerando comportamentos aversivos ao contato com o homem. Deste modo, foram avaliados dois tipos de identificação permanente utilizando o marcador confeccionado com liga de ferro já utilizado para identificar os animais do Setor de Equinos da UFRRJ, através da avaliação de dois grupos experimentais: um grupo com marcação a frio, com nitrogênio líquido, e outro com marcação a quente, com ferro candente, para, futuramente, ser implementado o melhor método para uso no setor de equinos e possíveis criatórios do Brasil.

3.5 Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo foi comparar os níveis de estresse, nas respostas fisiológicas, comportamentais, e a qualidade da marcação a ferro quente e a frio, com nitrogênio líquido nos potros.

3.5.1 Objetivos específicos

- Estudar as alterações fisiológicas através da frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca, do cortisol sérico, antes, durante e após marcação a quente, com ferro candente nos potros.
- Estudar as alterações fisiológicas pela frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca, cortisol sérico, antes, durante e após a marcação a frio, com nitrogênio líquido nos potros.
- Avaliar o comportamento do animal durante o processo de marcação, através de filmagem e elaboração de uma tabela própria para aferir o comportamento e a reatividade do potro durante as marcações a fogo e a nitrogênio líquido.
- Acompanhar a evolução da ferida e sua nitidez na pele através da fotografia da região após marcação a frio, com nitrogênio líquido e da marcação a quente, com ferro candente nos potros antes do desmame até sua completa cicatrização.

3.6 Material e Métodos

O experimento foi aprovado pela comissão de ética e bem-estar do Instituto de

Veterinária, UFRRJ, de acordo com o protocolo nº 2640020517 (Anexo A).

Foram utilizados 23 potros: 17 da raça Mangalarga Marchador e 6 mestiços de Mangalarga Marchador, com idade de 20 a 28 semanas, sendo 16 fêmeas e 7 machos. Os animais pertencentes ao setor de Equinocultura da UFRRJ, foram criados juntos, desde o seu nascimento, estando adaptados aos pastos e as instalações. Os potros foram manipulados e medidos, semanalmente, estando adaptados à presença e ao contato com o ser humano. Os potros foram aleatoriamente divididos em dois grupos experimentais e marcados conforme descrito por Caja et al. (2004) para o protocolo de marcação a quente e Householder et al. (1992) para marcação a frio, seguindo as orientações de fabricantes de marcadores confeccionados com liga férrea.

1- Grupo fogo (n=11): Potros marcados a quente, com a utilização de ferro candente. O ferro foi aquecido num fogareiro a gás liquefeito de petróleo (gás de cozinha) até atingir a coloração rubro clara, sendo posicionado na região do braço esquerdo (musculatura do tríceps). O ferro permaneceu em contato com a pele do animal por até 3 segundos.

2- Grupo nitrogênio (n=12): Potros marcados a frio, com a utilização de ferro congelado por nitrogênio líquido. O ferro permaneceu na pele do animal por 60 segundos.

Os potros foram marcados aproximadamente um mês antes do processo de desmame, na presença de suas respectivas mães. No dia anterior à marcação, os potros foram cabresteados, e conduzidos com as mães para o tronco de contenção, onde foi colocado o frequencímetro para adaptação, e a região do braço esquerdo (musculatura do tríceps) foi tricotomizada com tricótomo e lâmina de barbear descartável Gillette® facilitando o manejo de limpeza da ferida. Foi realizada uma marcação única, de acordo com o grupo experimental a que o animal foi, aleatoriamente, designado. As marcações foram realizadas no período da manhã, em média os horários de 9:52 (marcação a fogo) e 9:31 (marcação a nitrogênio), as temperaturas médias dos dias da marcação a fogo foram 26°C e do dia da marcação a nitrogênio foram 25°C.

3.6.1 Protocolo experimental:

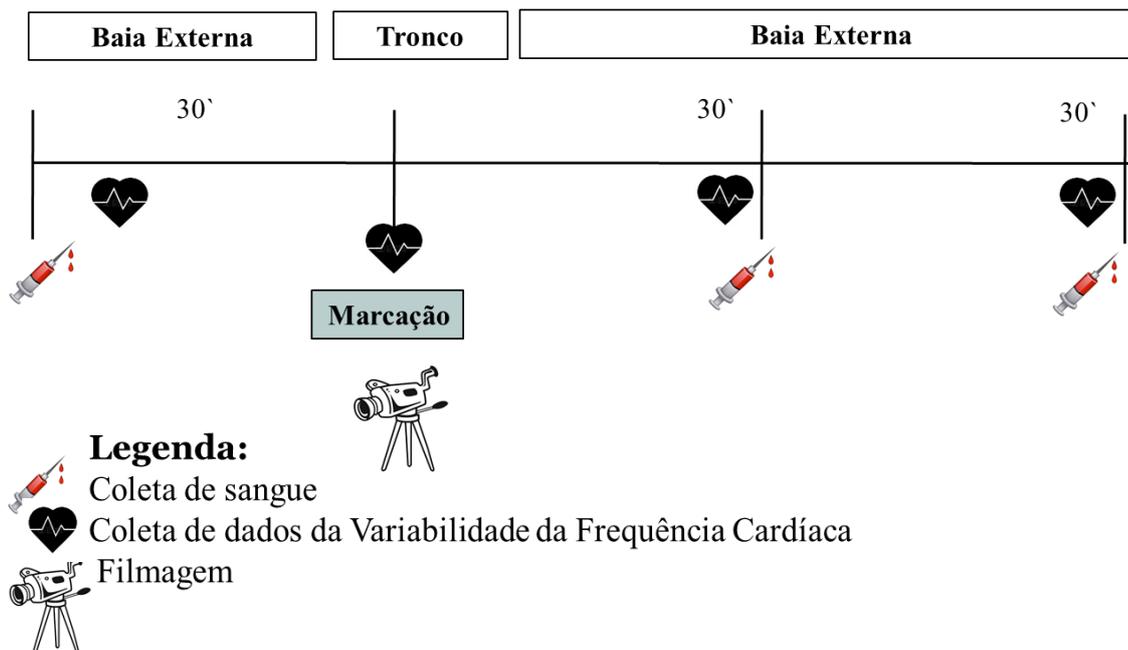


Figura 2: Ilustração esquemática do protocolo experimental.

No dia do experimento, como de costume, os potros e as respectivas mães foram separados no pasto e conduzidos em dupla (mãe e potro) para as baias externas, fechadas com a utilização de cordas. Após todos os animais estarem dispostos em suas respectivas baias, foram colocados os cabrestos, individualmente, e realizada a primeira coleta de sangue (momento basal). As coletas de sangue foram realizadas com agulha para coleta de sangue a vácuo em tubos com ativador de soro e sem anticoagulante, “com tampa vermelha”, nos momentos: basal (30 minutos antes da marcação), pós 30 (após 30 minutos da marcação) e pós 60 (após 60 minutos da marcação). Imediatamente após a coleta de sangue basal, foi colocado no tórax do animal o frequencímetro Polar Equine® RS800 e ativado. O potro permaneceu com o frequencímetro durante todo o período experimental.

Na realização do procedimento de marcação, o potro e a égua foram conduzidos para o tronco de contenção dupla, ficando a matriz contida ao lado do potro. Após a entrada no tronco, foi utilizado o cachimbo no lábio superior do potro, como método de contenção, a fim de imobilizar o animal durante o processo de marcação, evitando acidentes e garantindo o tempo da marcação.

Os potros foram marcados de acordo com o grupo experimental previamente selecionado e o momento foi registrado em vídeo para posterior análise comportamental. As marcações a fogo e a nitrogênio foram realizadas sempre pelo mesmo indivíduo, treinado para realização do procedimento. Foi utilizado o mesmo marcador de liga férrea contendo os números “47”, com dimensões totais de 6,5cm de altura e 8,5 cm de largura.

Nas marcações a fogo, foi utilizado o ferro candente, previamente aquecido com gás liquefeito, a marca permaneceu por 3 segundos em contato com a pele do braço esquerdo do potro (Figura 3), e no grupo de animais marcados a nitrogênio, foi utilizado o mesmo ferro, porém congelado com nitrogênio líquido, e a marca permaneceu em contato com a pele por 60 segundos (Figura 4).

Após a retirada do ferro que estava em contato com a pele, foi realizado o tratamento da ferida, sendo utilizado um spray larvicida, cicatrizante e antimicrobiano, composto por sulfadiazina de prata, fipronil e alumínio, conferindo à marcação uma coloração prata.

Após o término da marcação, os potros, juntamente com a mãe, retornaram à baia externa onde permaneceram por 60 minutos para realização das coletas pós 30 e pós 60. No término do experimento ambos foram soltos no pasto, como de costume. Nos dias subsequentes, os potros foram manejados, diariamente, para o tratamento da ferida pós marcação, foi realizada a limpeza da ferida e a aplicação do *spray* (larvicida, cicatrizante e antimicrobiano) sobre a marca. Foram realizadas fotografias das marcas nos dias subsequentes para posterior análise da nitidez da marcação.

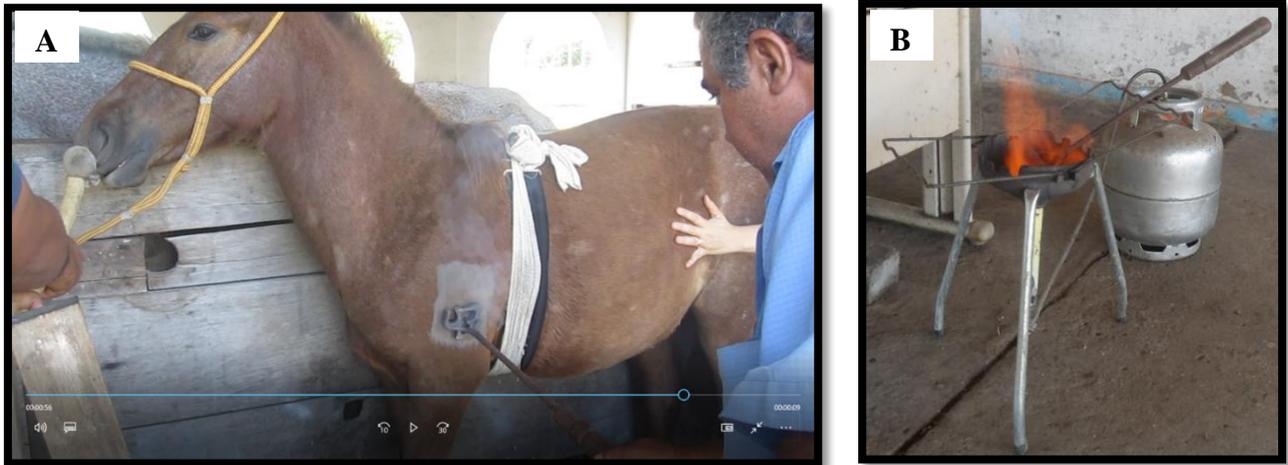


Figura 3: (A). Momento da marcação de um animal do grupo fogo. (B). Fogareiro aquecendo o marcador.



Figura 4: (A). Momento da marcação de um animal do grupo nitrogênio. (B). Marcador sendo congelado em um isopor utilizando nitrogênio líquido.

3.6.2 Frequência cardíaca e a variabilidade da frequência cardíaca

No presente projeto foi utilizado o cardiofrequencímetro específico para uso em equinos, RS 800 (Polar Equine®), programado para gravar o intervalo de tempo em milisegundos entre as sucessivas despolarizações do ventrículo esquerdo, representadas pelas ondas R-R, através da ativação do modo RR, presente nas configurações do relógio.

O Polar Equine® representa um sistema de gravação móvel, que capta os dados gravados por um transmissor preso no tórax do cavalo por uma cinta elástica. Nesta cinta existem dois eletrodos (um para região precordial, abaixo do codilho esquerdo e outro eletrodo próximo a cernelha na região torácica) que foram abundantemente umedecidos com uma solução saturada de água e sal, a fim de garantir uma boa condução dos impulsos elétricos a região do tórax.

Os dados armazenados no relógio foram enviados para o programa Polar Pro Trainer Equine Edition® por meio da interface de emissão de infravermelhos. Os dados foram apresentados num gráfico confeccionado a partir da HR (bpm) em razão do tempo (Figura 5).

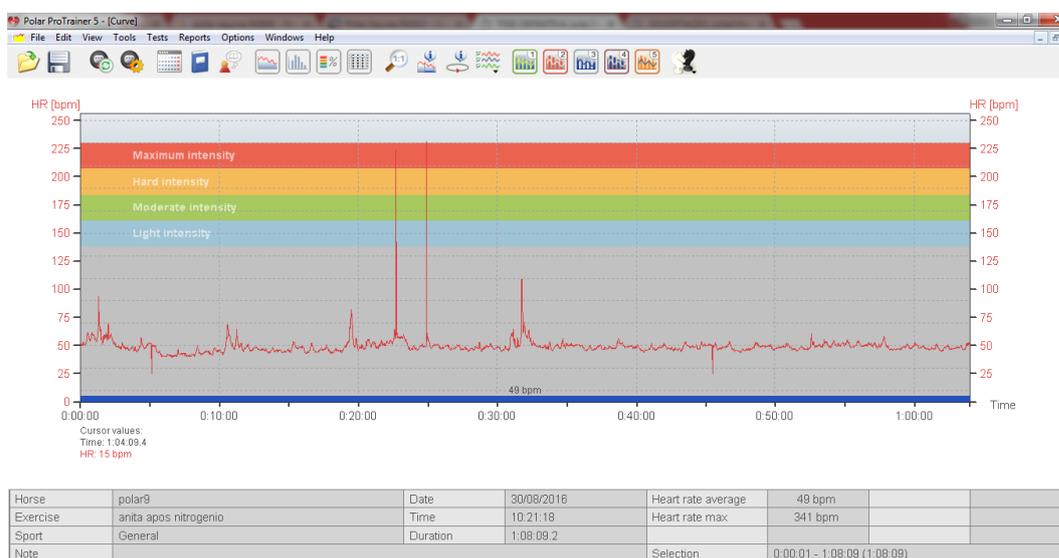


Figura 5: Gráfico das oscilações da Frequência Cardíaca pelo intervalo de tempo, disponibilizado pelo programa Polar ProTrainer 5®.

Os dados armazenados pelo programa Polar ProTrainer Equine Edition 5®, após exportação para arquivos no formato .txt, foram analisados no programa Microsoft Office Excel 2013®, obtendo-se uma lista de sucessivos valores em milissegundos (ms), representando os intervalos RR. Foi realizada a correção de alguns artefatos de leitura, através da substituição dos valores dos intervalos RR discrepantes, pela média entre os valores dos dois intervalos RR anteriores e os dois posteriores (VON BORELL et al., 2007). Foram rejeitados os segmentos com correções maiores de 20% (PELTOLA, 2012), e utilizados segmentos com até 95% de batimentos sinusais (VANDERLEI et al., 2009).

Após a retirada dos artefatos e escolha dos segmentos avaliados, foram gravados no arquivo de texto (TXT) os valores do intervalo RR em milissegundos e do tempo em segundo, para posterior análise pelo programa CardioSeries v2.4®. O programa disponibiliza os valores dos parâmetros da análise da HRV no domínio do tempo (Figura 6) e no domínio da frequência (Figura 7) através da Transformada Rápida de Fourier (FFT).

Os valores das variáveis utilizadas no programa CardioSeries v2.4® foram padronizadas em: LF 0,01 – 0,07; HF – 0,07 – 0,5; taxa de interpolação = 4 e tamanho dos segmentos = 256 valores.

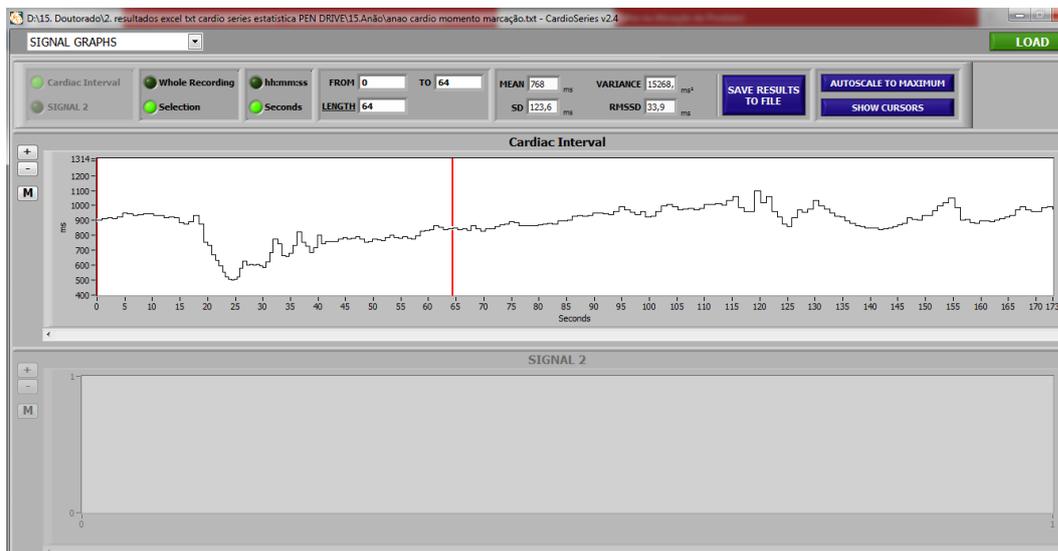


Figura 6: Análise da HRV, através do domínio do tempo, programa Cardio Series v 2.4®, demonstrando o tacograma com valores de RR(ms) em função do tempo(s).

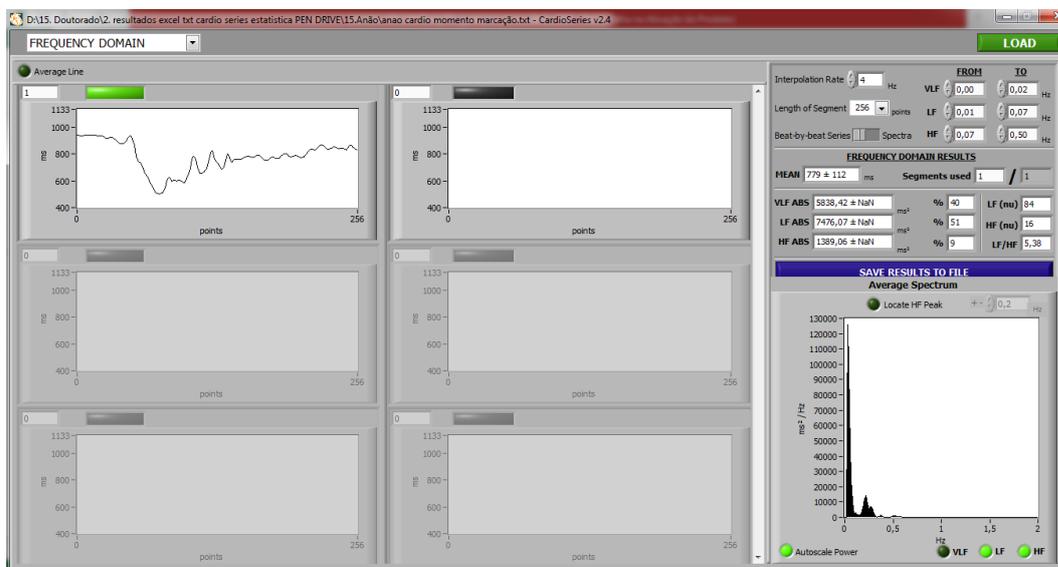


Figura 7: Análise da HRV, domínio da frequência, através da Transformada Rápida de Fourier, programa Cardio Series v 2.4®.

A avaliação dos índices da variabilidade da frequência cardíaca (HRV), no domínio da frequência e no domínio do tempo, foram analisados em 18 animais (Fogo, n=10 e Nitrogênio, n=8). Foram avaliados os segmentos de intervalos RR, a partir da seleção de 64 segundos nos seguintes intervalos de tempo: **basal** (25-20 minutos antes da marcação), **marcação** (momento que o ferro frio (nitrogênio) ou quente (fogo) foi encostado no animal), **pós 30** (20-25 minutos após a marcação) e **pós 60** (50-55º minutos da marcação).

Para a obtenção da HRV no momento da **marcação**, não foi considerado os dados da HRV no início da colocação do cachimbo, pois este ato gerou um aumento na HR, e esses resultados não estão relacionados com a marcação propriamente dita, pois ambos os grupos utilizaram o cachimbo como forma de contenção. Assim o tempo estipulado para análise da marcação abrangiu os dados captados entre quatro segundos antes de iniciar a marcação com o nitrogênio líquido, e cerca de 20 segundos antes de iniciar a marcação no grupo fogo até completar 64 segundos, não abrangendo o momento da aplicação do *spray* em ambos os grupos.

3.6.3 Cortisol

Os níveis de cortisol sérico foram avaliados no Laboratório de Neuroendocrinologia Comportamental do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ pela técnica de radioimunoensaio (RIE). As amostras de sangue foram acondicionadas em tubo sem anticoagulante, sob refrigeração e ao final do experimento foram centrifugadas na velocidade 3000 RPM por 20 minutos e os soros foram estocados em freezer a -20°C. Todos os ensaios/dosagens foram realizados em duplicata. Após descongelamento das amostras à temperatura ambiente e identificação dos tubos, foi pipetado em duplicata, 25µL de diferentes concentrações padrões de cortisol do kit (0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 3; 10; 30; 100 µg/dL) nos tubos, adicionando-se 25µL dos soros testes e em seguida testados e, posteriormente, adicionado 1,0 mL de cortisol. Os tubos foram incubados em banho-maria por 45 minutos a 37°C +/- 1°C sendo feita, em seguida, decantação e secagem de todos utilizando um papel absorvente. A contagem foi realizada em um contador gama calibrado para iodo radiativo (I125) da marca Wallac®. Após as leituras, foi confeccionado o gráfico da curva padrão de acordo com as instruções do kit, e os valores de cortisol das amostras testadas foram calculados a partir dos valores de radioatividade obtidos, individualmente, em relação aos valores da curva padrão. Os cálculos dos valores testes apresentados em µg/dL foram realizados através do programa Graph Prism 5.0®. Para a manutenção da confiabilidade do teste, todos os valores estavam dentro dos valores da curva padrão, não sendo considerados os valores fora da curva.

3.6.4 Análise comportamental

A análise comportamental foi realizada através do preenchimento de um etograma, por dois veterinários capacitados. O momento da marcação foi filmado, utilizando uma máquina Canon® e os vídeos foram armazenados para posterior análise. Foram avaliados os diferentes comportamentos como: movimento geral, repouso, movimento da cabeça, movimento do corpo, movimento dos membros, movimento do membro anterior esquerdo, movimento corpo e membros, aparecimentos de vocalização, coice e empinar (Tabela 1). Os comportamentos foram analisados quanto à frequência: número de ocorrência divididos pela duração do evento em segundos. Desta forma, o número de ocorrência de cada comportamento listado na Tabela 1, foi somado durante todo o evento, este somatório total foi dividido por 6 segundos no grupo fogo (tempo total de marcação pelo ferro quente), e por 60 segundos no grupo nitrogênio (tempo total de marcação pelo nitrogênio). A partir desse resultado pode-se comparar o número de ocorrências por segundo em cada grupo.

Tabela 1: Descrição dos comportamentos avaliados durante a marcação a fogo e a nitrogênio líquido.

Comportamento	Descrição
Parado	Período que não houve movimentação
Movimento geral	Somatório de tempo que houve alguma movimentação da cabeça, corpo ou membros
Movimento cabeça	Movimentação leve a moderada da cabeça e pescoço para frente, trás e/ ou lateral
Movimento corpo	Movimentação leve a moderada do corpo para frente, trás e/ ou lateral
Movimento membros	Movimentação leve a moderada dos membros para cima, frente, trás e/ ou lateral (exceto membro anterior esquerdo)
Movimento membro anterior esquerdo	Movimentação leve a moderada do corpo e/ou do membro anterior esquerdo para frente, trás e/ ou lateral
Movimento corpo e membros	Movimentação leve a moderada do corpo e membros simultaneamente para frente, trás e/ ou lateral (exceto membro esquerdo)
Vocalizar	Emitir sons de desagrado, denominado guincho
Coicear	Ato de bater com os membros traseiros
Empinar	Erguer o corpo e membros em posição vertical
Reatividade a dor	Avaliação do comportamento do animal, analisando os movimentos da cabeça, corpo e membros durante o ato da marcação

Foi avaliada a reatividade a dor, sendo atribuído escore variando de 0 a 5 (Tabela 2). Essa análise ocorreu por intensidade e envolveu a percepção dos avaliadores quanto ao aparecimento das reações aversivas do animal, através de uma análise integrativa dos movimentos de cabeça, membros e corpo e o aparecimento da vocalização durante o ato de marcação, sendo 5 o escore máximo (Figura 8).

Tabela 2: Escore de reatividade durante a marcação.

Escore	
0	Ausência de reação
1	Reação leve dos movimentos: cabeça, corpo e membros
2	Reação leve dos movimentos de cabeça e moderada reação do corpo e membros
3	Reação moderada dos movimentos: cabeça, corpo e membros
4	Reação moderada dos movimentos de cabeça e reação intensa dos movimentos: corpo e membros
5	Reação exacerbada de movimentação dos membros e corpo



Figura 8: Fotografia representando o escore 5 de reatividade no momento da marcação a fogo.

3.6.5 Análise das feridas da marcação

Os momentos escolhidos para realizar a análise das fotografias foram: antes (imediatamente antes da realização da marcação), após (imediatamente após a realização da marcação), 1d (um dia após a marcação), 6d (seis dias após a marcação), 12d (doze dias após a marcação) e 7m (setes meses após a marcação). A pele foi avaliada quanto a formação de ferida, presença de necrose, formação de exsudato e nitidez, sendo atribuído escore de 0 a 3, por dois veterinários experientes conforme descrição do Quadro 1.

Quadro 1: Escore de descrição das mudanças ocorridas na pele e a nitidez após as marcações a fogo e a nitrogênio líquido. Adaptado de Erber et al. (2012b).

Ferida Aberta	0	Ausente
	1	<20 % do local da marcação
	2	20 a 40% do local da marcação
	3	>40% do local da marcação
Necrose	0	Ausente
	1	Apenas visível
	2	Bem visível
	3	Pronunciada e/ou necrose grossa
Exsudato	0	Ausente
	1	Gotejamento em um local
	2	Gotejamento em mais de um local
	3	Plano expandido com exsudato
Nitidez	0	0 a 25% da marcação visível
	1	26% a 50% da marcação visível
	2	51 a 75% da marcação visível
	3	>76% da marcação visível

3.6.6 Análises estatística

Os resultados dos parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca e do cortisol sérico foram avaliados pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas, quando significativas foram comparadas pelo Teste de Bonferroni. Os resultados obtidos pela análise comportamental foram avaliados pelo teste Mann Whitney, para medidas não paramétricas. A análise do fator sexo (macho e fêmea) na reatividade a dor foi avaliada pela ANOVA de duas vias sem medidas repetidas. Os escores obtidos pela análise da ferida, necrose, exsudato e nitidez foram avaliados pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas, quando significativas foram comparadas pelo teste de comparação múltipla de Sidak's. As análises estatísticas foram realizadas utilizando intervalo de confiança de 95% e probabilidade de 5%. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os gráficos foram construídos usando GraphPad Prism 5.0 (Software GraphPad).

3.7 Resultados

3.7.1 Frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca

O ato da marcação aumentou a frequência cardíaca em ambos os grupos fogo e nitrogênio (Anova de duas-vias, fator tempo, $F_{(3, 48)} = 15,15$; $p < 0,0001$). Além disso, a HR do grupo fogo foi significativamente maior em comparação ao grupo nitrogênio no momento da marcação (fator interação, $F_{(3, 48)} = 3,143$, $p = 0,0336$), Teste de Bonferroni: $p < 0,01$) (Figura 9 D).

No momento basal, foi observado uma frequência cardíaca média de $53,33 \pm 1,89$ bpm e $54,09 \pm 1,65$ bpm nos grupos fogo e nitrogênio respectivamente, houve um aumento após a marcação para $78,81 \pm 7,01$ bpm e $62,14 \pm 4,30$ bpm, sendo observado o retorno aos valores de HR média no momento após 30 min.

Ao avaliar a HRV no domínio da frequência foi observado que a marcação aumentou a razão LF/HF independente do grupo (fator tempo, $F_{(3, 48)} = 33,57$; $p < 0,0001$). O grupo nitrogênio apresentou LF/HF diferente do grupo fogo, independentemente do tempo (fator Grupo, $F_{(1, 16)} = 9,153$; $p = 0,0080$). Além disso, no momento da marcação, o grupo nitrogênio apresentou a razão LF/HF menor que o grupo fogo (fator interação, $F_{(3, 48)} = 8,953$; Teste de Bonferroni $p < 0,0001$). Da mesma forma, na análise das potências das bandas de baixa (LF) e alta frequência (HF), a marcação aumentou a potência da banda de LF e reduziu a potência da banda de HF do espectro dos intervalos cardíacos em ambos os grupos (fator Tempo, $F_{(3, 48)} = 33,83$, $p < 0,0001$), os grupos foram diferentes independente do tempo (fator grupo, $F_{(1, 16)} = 6,395$, $p = 0,0223$) e o grupo fogo obteve LF maior e HF menor no momento da marcação (fator interação, $F_{(3, 48)} = 3,125$, $p = 0,0343$, teste de Bonferroni $p < 0,01$) (Figura 9 B –C).

Os parâmetros de HRV no domínio do tempo indicaram que o SDNN, aumentou em ambos os grupos fogo e nitrogênio (fator tempo, $F_{(3, 48)} = 25,37$, $p < 0,0001$), sendo que o grupo fogo apresentou maior SDNN que o grupo nitrogênio no momento da marcação (fator interação, $F_{(3, 48)} = 3,238$, $p = 0,0301$; teste de Bonferroni $p < 0,01$) (Figura 9 F). Na análise da RMSSD, observou-se a diferença significativa no momento marcação independentemente dos grupos (fator tempo, $F_{(3, 48)} = 17,25$, $p < 0,0001$; teste de Bonferroni $p < 0,0001$) (Figura 9 E). A análise da razão SDNN/RMSSD, demonstrou que o momento da marcação foi capaz de aumentar a razão SDNN/RMSSD (fator tempo, $F_{(3, 48)} = 8,562$, $p = 0,0001$; teste de Bonferroni $p < 0,01$). Os grupos foram diferentes independentemente do tempo (fator grupo, $F_{(1, 16)} = 8,088$, $p = 0,0117$), porém não foi possível analisar diferença significativa na interação grupo e tempo ($F_{(3, 48)} = 2,535$, $p = 0,0678$) (Figura 9 G).

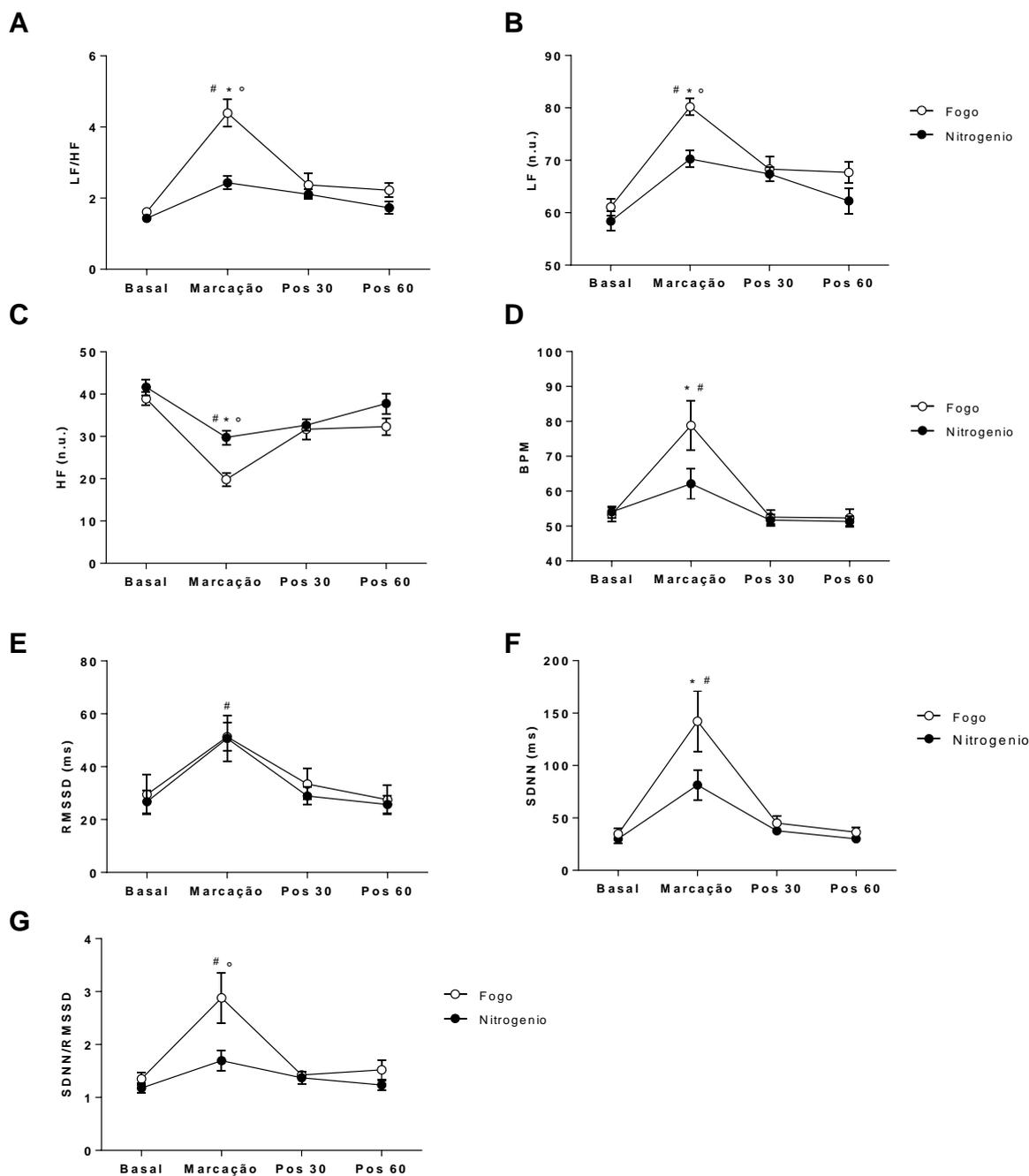


Figura 9: Índices da Variabilidade da Frequência Cardíaca em resposta a marcação a quente com ferro incandescente (grupo fogo n= 10) e da marcação a frio utilizando ferro com nitrogênio líquido (grupo nitrogênio n=8) em potros da raça mangalarga marchador e mestiços. Os dados são apresentados como média \pm EPM, nos momentos Basal, marcação, pós 30 e pós 60. (A) Razão LF/HF. (B) Componente de baixa frequência LF. (C) Componente de alta frequência HF. (D) Frequência Cardíaca Média. (E) RMSSD (raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, em um intervalo de tempo, expresso em ms). (F) SDNN (desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo, expresso em ms). (G) SDNN/RMSSD. (*) Diferença significativa no fator interação grupo x tempo. (#) Diferença significativa no fator tempo. (°) diferença significativa no fator grupo.

3.7.2 Cortisol

Na análise dos níveis de cortisol sérico, não houve diferença significativa nos fatores tempo ($F_{(2, 20)} = 2,994$, $p = 0,0729$), interação ($F_{(2, 20)} = 0,3919$, $p = 0,6809$) e grupo ($F_{(1, 10)} = 0,07708$, $p = 0,7870$) (Figura 10).

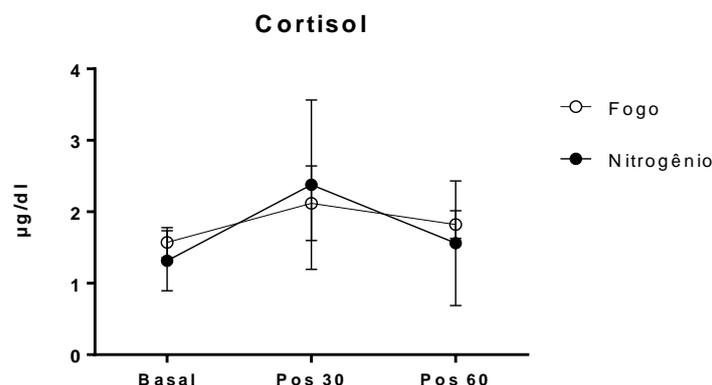


Figura 10: Efeito das marcações no grupo fogo e no grupo nitrogênio quanto aos níveis de cortisol de potros. Os dados são apresentados como média \pm EPM nos momentos Basal ($n=6$), após 30 minutos da marcação ($n=6$) e 60 min após marcação ($n=6$). Análise através da ANOVA de duas vias ($p < 0,05$). Os animais marcados com ferro frio foram representados como Nitrogênio e os animais marcados com ferro quente foram representados como Fogo.

3.7.3 Comportamento

O comportamento foi analisado quanto à frequência: número de ocorrência dividido pela duração do evento em segundos. Desta forma, o número de ocorrência dos comportamentos foi dividido por 6 segundos no grupo fogo (tempo total de marcação pelo ferro quente), e por 60 segundos no grupo nitrogênio (tempo total de marcação pelo nitrogênio). A reatividade a dor foi avaliada, atribuindo-se escores variando de 0 a 5.

Não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos fogo e nitrogênio na frequência de reações dos movimentos da região da cabeça, corpo, membro anterior esquerdo, e dos movimentos simultâneos do corpo e membros e da presença de vocalização. No entanto, o grupo fogo apresentou maior frequência de movimentos de membros ($p = 0,031$) em relação ao grupo nitrogênio.

Não foram observadas diferenças significativas na reatividade a dor, entre os grupos fogo e nitrogênio. Apesar de reações exacerbadas como escoicear e empinar terem sido observadas apenas no grupo fogo, a análise estatística também não detectou diferença entre os grupos nestes parâmetros.

A duração em segundos da presença do movimento em geral e permanência sem movimento (parado) foram expressos em frequência (duração da ocorrência dividido pelo tempo de análise, 6 segundos para o fogo e 60 segundos para nitrogênio). O grupo nitrogênio obteve uma maior frequência de animais parados e conseqüentemente apresentou menor movimento em geral ($p < 0,0001$) que o grupo fogo. Em porcentagem os animais do grupo fogo, durante as marcações, apresentaram 65% de movimento geral e 35% do tempo parado, enquanto que os animais do grupo nitrogênio apresentaram 16% de movimento geral e 84% de tempo parado (Tabela 3).

Tabela 3: Análise comportamental durante a marcação com fogo e nitrogênio líquido por 60 segundos

	Fogo	Nitrogênio	P
Parado	0,35±0,07	0,84±0,05	< 0,0001****
Movimento geral	0,65±0,07	0,16±0,05	< 0,0001****
Mov. Cabeça	0,14±0,04	0,02±0,01	0,2367
Mov. Corpo	0,14±0,05	0,029±0,01	0,1477
Mov. Membros	0,23±0,06	0,04±0,01	0,031*
Mov. Membro anterior esquerdo	0,15±0,04	0,03±0,01	0,1353
Mov. Corpo e membros	0,15±0,04	0,03±0,01	0,175
Vocalizar	0,18±0,12	0,08±0,08	0,2174
Coicear	0,09±0,09	0	0,4783
Empinar	0,18±0,12	0	0,2174
Reatividade a dor	2,82±0,46	2,12±0,33	0,2606

Nota: grupo marcado com fogo (n=12) e com nitrogênio líquido (n=11) e em potros da raça mangalarga marchador e mestiços. Os dados são apresentados como média ± EPM.

Considerando que esta forma de análise apresenta limitações, uma vez que os tempos de análise são muito diferentes entre os dois grupos (o tempo de estímulo do fogo é de seis segundos e o do nitrogênio é de 60 segundos), optou-se por analisar apenas os primeiros 12 segundos do estímulo nitrogênio. Esta primeira fase da marcação com nitrogênio é o período em que os animais apresentam maiores reações comportamentais. Vale ressaltar que na identificação com nitrogênio líquido utilizando marcador de aço inox (ao invés do ferro), o tempo necessário de permanência do ferro na pele do animal é de 12 segundos, enquanto que no marcador de liga-férrica o tempo necessário é de 60 segundos. Desta forma, foi realizada a comparação entre o grupo fogo (6 segundos de análise) e grupo nitrogênio (análise dos primeiros 12 segundos de estímulo) (Tabela 4). Nesta análise pode-se observar que o grupo nitrogênio apresentou menor frequência dos movimentos dos membros (p=0,02) e de movimento do membro anterior esquerdo (p=0,03), onde é realizada a marcação, além de apresentar maior tempo parado e com menor tempo em movimento comparado ao grupo fogo. Os demais comportamentos não foram diferentes entre os grupos fogo e nitrogênio (Tabela 4).

Tabela 4: Análise comportamental durante a marcação com fogo e nitrogênio líquido por 12 segundos.

	Fogo	Nitrogênio	P
Repouso	0,35±0,07	0,80±0,07	0,0004***
Movimento geral	0,65±0,07	0,20±0,07	0,0004***
Mov. Cabeça	0,14±0,04	0,04±0,03	0,0805
Mov. Corpo	0,14±0,05	0,04±0,02	0,5054
Mov. Membros	0,23±0,06	0,05±0,02	0,0204*
Mov. Membro anterior esquerdo	0,15±0,04	0,03±0,01	0,0363*
Mov. Corpo e membros	0,15±0,04	0,04±0,02	0,0512
Vocalizar	0,18±0,12	0	0,2174
Coicear	0,09±0,09	0	0,4783
Empinar	0,18±0,12	0	0,2174
Reatividade a dor	2,82±0,46	2,12±0,33	0,2606

Nota: grupo marcado com fogo (n=12) e com nitrogênio líquido (n=11) e em potros da raça mangalarga marchador e mestiços. Os dados são apresentados como média ± EPM. (*) Diferença significativa.

Na reatividade a dor, o fator sexo foi avaliado separadamente, e não foram encontradas diferenças significativas entre os sexos (p=0,1127), conforme Tabela 5.

Tabela 5: Análise do fator sexo na reatividade a dor durante a marcação.

	Fêmea	Macho	P
Fogo	2,94±0,62	2,5±0,5	ns
Nitrogênio	1,72±0,25	3,33±0,88	ns

Nota: Animais marcados no grupo fogo (n=12) e com nitrogênio líquido (n=11) e em potros da raça mangalarga marchador e mestiços. Os dados são apresentados como média ± EPM. (ns): indica que não houve diferença significativa.

3.7.4 Análise das feridas

Imediatamente após a marcação observou-se formação de ferida no grupo fogo, podendo haver necrose, porém no grupo nitrogênio, foi observado apenas edema. Apenas no grupo nitrogênio observou-se um edema acentuado no local da marcação, e este desapareceu após 24 horas. Um dia após o tratamento a marcação do grupo fogo estava bem visível e não havia ferida pronunciada, pois as feridas ainda continham o “*spray*” como proteção, algumas destas apresentaram um pequeno exsudato. No grupo nitrogênio, a marcação não era visível 24 horas após a sua realização, sendo pronunciada a sua visibilidade após 6 dias. No grupo fogo, após 12 dias, alguns animais apresentavam necrose ou a presença de feridas abertas, e no grupo nitrogênio foram encontradas apenas feridas superficiais. No vigésimo quinto dia, as feridas já haviam cicatrizado no grupo fogo, entretanto os pelos ainda não haviam crescido, enquanto que no grupo nitrogênio o símbolo da marcação na coloração branca já era visível, devido ao crescimento dos pelos. No grupo nitrogênio, a partir do 45º dia os pelos estavam maiores e as marcas encontram-se mais visíveis. No grupo fogo as marcações não sofrem alterações a partir do 2º mês permanecendo iguais até 7º mês. No grupo nitrogênio, as marcações a partir do segundo, terceiro e quarto mês apresentaram pelos com a coloração branca, sendo que, a partir

do quinto mês, os pelos brancos caíram e ficou nítida a pele escura dos animais (Figura 11-12).

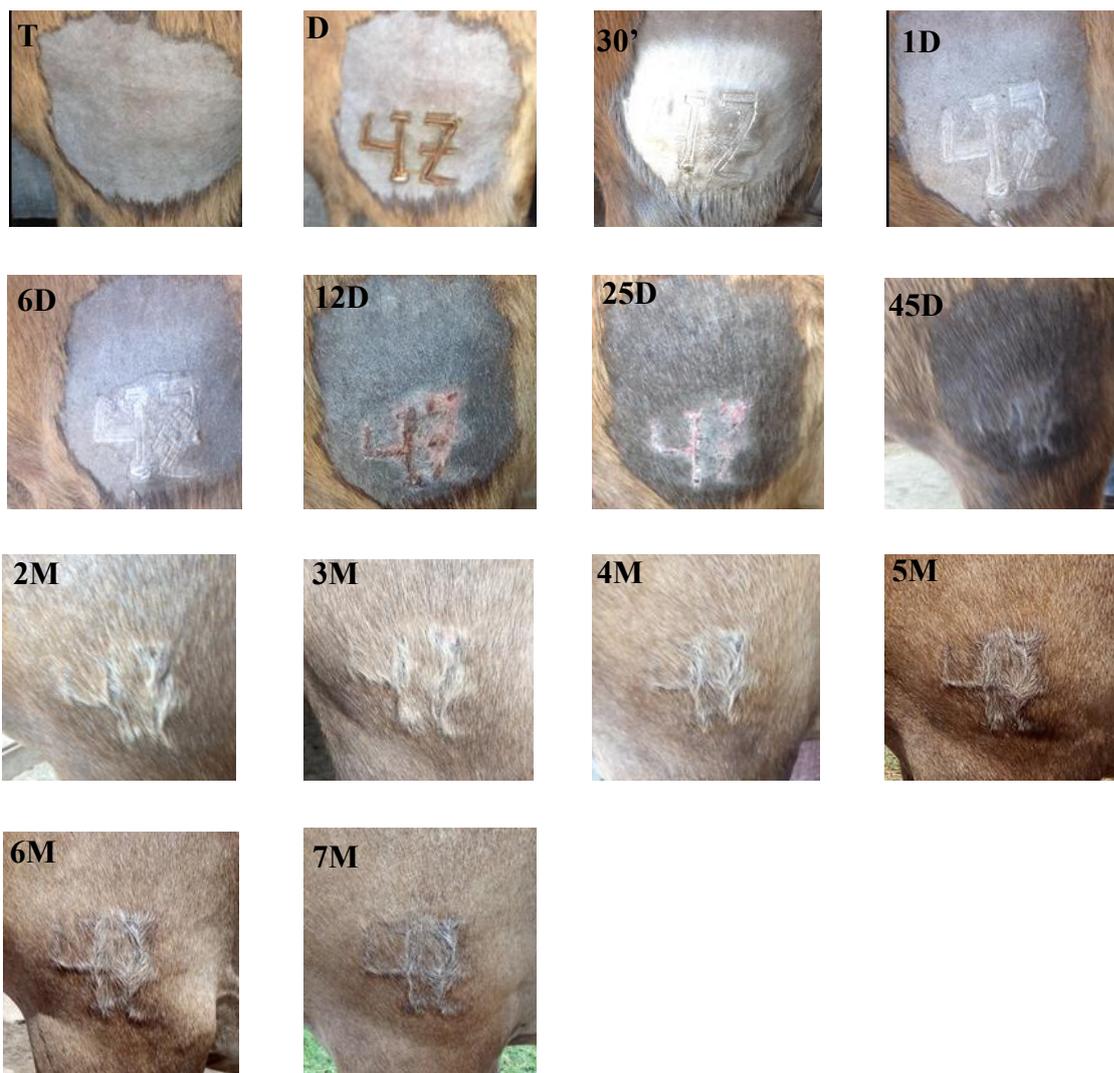


Figura 11: Fotografia demonstrando a evolução da marcação no grupo fogo em diferentes momentos no mesmo animal. (T) Pele tricotomizada antes da marcação. (D) Momento imediatamente após a marcação. (30') 30 Minutos após a marcação. (1D) Um dia após a marcação. (6D) Seis dias após a marcação. (12D) Doze dias após a marcação. (25D) Vinte e cinco dias após a marcação. (45D) Quarenta e cinco dias após a marcação. (2M) Dois meses após a marcação. (3M) Três meses após a marcação. (4M) Quatro meses após a marcação. (5M) Cinco meses após a marcação. (6M) Seis meses após a marcação. (7M) Sete meses após a marcação.

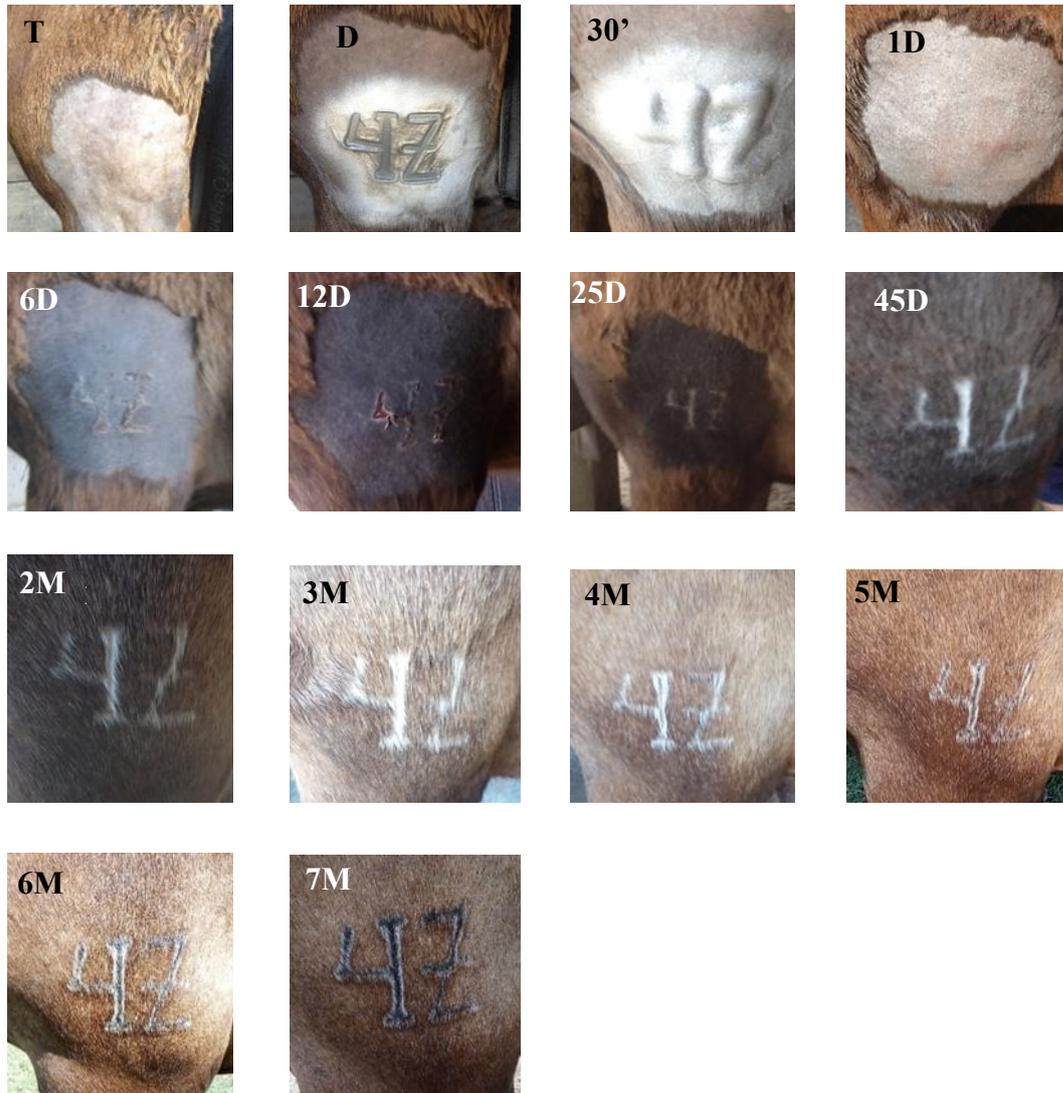


Figura 12: Fotografia demonstrando a evolução da marcação no grupo nitrogênio em diferentes momentos no mesmo animal. (T) Pele tricotomizada antes da marcação. (D) Momento imediatamente após a marcação. (30') 30 Minutos após a marcação. (1D) Um dia após a marcação. (6D) Seis dias após a marcação. (12D) Doze dias após a marcação. (25D) Vinte e cinco dias após a marcação. (45D) Quarenta e cinco dias após a marcação. (2M) Dois meses após a marcação. (3M) Três meses após a marcação. (4M) Quatro meses após a marcação. (5M) Cinco meses após a marcação. (6M) Seis meses após a marcação (7M) Sete meses após a marcação.



Figura 13: Foto de dois potros manga-larga marchador em perfil lateral. (A) Animal marcado a fogo. (B) Animal marcado a nitrogênio.

Os animais foram acompanhados a cada dois dias durante os primeiros 15 dias, sendo realizada a limpeza da ferida com remoção de tecido necrótico, e aplicação do *spray*. Após a completa cicatrização, a evolução das marcações foram acompanhadas, mensalmente, a fim de avaliar a legibilidade da marcação. A marcação a fogo gerou feridas como as demonstradas na Figura 14, porém devido ao tratamento diário com aplicação de *spray*, não foram observadas míases nos locais das marcações, provavelmente o *spray* criou uma camada auxiliando na cicatrização e evitando que moscas depositassem ovos na ferida (Figura 14).



Figura 14: Feridas mais intensas encontradas nas marcações a fogo no período de 6 a 12 dias após a marcação, em seis diferentes animais.

Após a realização da marcação a fogo houve formação de ferida e necrose significativa ($p < 0,0001$) em relação ao grupo nitrogênio (Tabela 6). Após 7 meses a pele de ambos os grupos estavam cicatrizadas.

Tabela 6: Escore na avaliação das marcações a fogo e a nitrogênio.

GRUPO	FERIDA		P	NECROSE		P	EXSUDATO		P
	Fogo	Nitrogênio		Fogo	Nitrogênio		Fogo	Nitrogênio	
ANTES	0±0	0±0	ns	0±0	0±0	ns	0±0	0±0	ns
APÓS	0,90±0,15	0±0	****	1,5±0,09	0±0	****	0±0	0±0	ns
1D	0±0	0±0	ns	0,32±0,14	0±0	*	0,27±0,19	0±0	*
6D	0,73±0,31	0,042±0,04	***	0,5±0,15	0±0	***	0,04±0,04	0±0	ns
12D	0,86±0,25	0,12±0,09	***	0,40±0,20	0±0	**	0,18±0,14	0±0	ns
7M	0±0	0±0	ns	0±0	0±0	ns	0±0	0±0	ns

Nota: resultados obtidos por escore na avaliação das marcações a fogo e a nitrogênio, quanto a formação de ferida, presença de necrose e formação de exsudato. Antes: momento antes da marcação. Após: momento imediatamente após a marcação, 1D: um dia após a marcação, 6D seis dias após a marcação, 12D: doze dias após a marcação, 7M: sete meses após a marcação. Valores representados por média ± EPM. Diferença significativa * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Na análise da nitidez da ferida foi obtida diferença significativa somente no momento imediatamente após a marcação, sendo a marcação a fogo mais nítida em relação a marcação a nitrogênio ($p < 0,005$) (Tabela 7).

Tabela 7: Escore de nitidez nas marcações no grupo fogo e no grupo nitrogênio

NITIDEZ	FOGO	NITROGÊNIO	P
ANTES	0±0	0±0	ns
APÓS	2,82±0,10	1,58±0,33	*
1D	2,09±0,28	1,125±0,30	ns
6D	1,40±0,30	1,67±0,34	ns
12D	1,5±0,33	2,12±0,28	ns
7M	1,5±0,34	2,12±0,28	ns

Nota: Tabela representando os resultados do escore na avaliação da nitidez nas marcações no grupo fogo e no grupo nitrogênio. Antes: momento antes da marcação. Após momento imediatamente após a marcação, 1D: um dia após a marcação, 6D seis dias após a marcação, 12D: doze dias após a marcação, 7M: sete meses após a marcação. Valores representados por média ± EPM. Diferença significativa * $p < 0,05$.

3.8 Discussão

O ato de identificar cavalos através da marcação permanente induziu respostas autonômicas na HRV em ambos os métodos a fogo e a nitrogênio, com aumento da modulação simpática em relação a parassimpática, e respostas comportamentais, indicativa de estresse. A marcação a nitrogênio obteve menores níveis de estresse por apresentar significativamente menores valores de HR, LF, LF/HF, SDNN e com formação de feridas superficiais, obtendo a mesma nitidez da marcação a fogo. A utilização de um marcador de liga férrea não proporcionou diferença significativa na nitidez das marcações após sete meses da aplicação das técnicas.

O ato da marcação é uma prática agropecuária muito comum no Brasil, porém não foram encontrados na literatura até o momento, estudos avaliando as marcações a quente e a frio em equinos, sendo esta comparação citada apenas em bovinos. Portanto nas discussões foram incluídos os dados obtidos em bovinos.

No momento da marcação observou-se uma elevação da frequência cardíaca em ambos os grupos (fogo e nitrogênio), porém o aumento no grupo fogo foi significativo, sugerindo um maior estresse. Tais achados corroboram com os estudos realizados em bovinos, nos quais demonstraram um aumento significativo da frequência cardíaca imediatamente após marcações a fogo quando comparadas a marcação a nitrogênio líquido e as marcações falsas (LAY et. al, 1992 a,b,c).

Nos estudos envolvendo equinos foram observados o aumento da HR nas marcações a fogo comparadas a introdução de microchip em cavalos adultos (LINDEGAARD et. al, 2009) e em potros (POLLMANN et al 1998). Entretanto Erber et al. (2012 b) obtiveram apenas um aumento transitório da HR de ambos (marcação a fogo e introdução de microchip), não obtendo diferença significativa entre os grupos e a interação grupo e tempo.

A avaliação da HRV, utilizando tempo ultra curto (64 segundos) permitiu a utilização de dados da HRV com uma maior confiabilidade, com mínimos erros de captação, principalmente no momento da marcação, que perdurou 60 segundos no grupo a frio. Entretanto Erber et al. (2012 b) utilizaram análises de cinco minutos, para avaliação da HRV no domínio do tempo, obtendo muitos artefatos na gravação, com isso ocorreu muitos comprometimentos em seus achados, erros que o nosso grupo reduziu ao realizar a análise da HRV em 64 segundos.

A HRV foi avaliada tanto no domínio da frequência quanto no domínio do tempo. A razão LF/HF, domínio da frequência, apresentou um aumento significativo, indicando maior estresse no grupo fogo em comparação ao grupo nitrogênio no momento da marcação. A razão SDNN/RMSSD, domínio do tempo, apresentou aumento no momento marcação, no grupo fogo, porém a interação grupo e o tempo não foi significativa. Em nossos achados a razão SDNN/RMSSD, não foi capaz de substituir a razão LF/HF, como sugerido por Sollers et al. (2007).

O aumento na razão LF/HF foi consequência do aumento significativo do componente de baixa frequência (LF) e da diminuição significativa do componente de alta frequência (HF). Considerando que o LF representa predomínio da atividade do sistema nervoso simpático e que HF representa exclusivamente a atividade vagal para o coração (HOSHI, 2009; VANDERLEI, 2009), pode-se concluir que houve um aumento da regulação simpática em relação a parassimpática nesse momento.

A análise da RMSSD, apresentou aumento significativo apenas no momento da marcação, corroborando com os achados de Erber et al. (2012b), que não encontraram diferença significativa entre os grupos estudados.

O índice SDNN demonstrou um aumento significativo no grupo fogo no momento da marcação, porém Erber et al. (2012b) encontraram apenas um aumento transitório após a marcação a fogo e a introdução do microchip. Quando o valor de SDNN está aumentado, não

é possível afirmar se há aumento do tônus simpático ou retirada do tônus vagal (VON BORELL et al., 2007), porém, é esperado um aumento dos valores no momento do estresse, como observado em nossos achados.

O presente estudo avaliou que não houve diferença significativa nos níveis de cortisol sérico entre os tratamentos, o procedimento de marcação gerou um estímulo muito curto, não sendo capaz de aumentar os níveis de cortisol nos intervalos avaliados, de um modo tão significativo como um estresse de transporte (SCHMIDT, et al.;2010b-c), treinamento (SCHMIDT, et al.,2010a) ou desmame (ERBER, et al., 2012a).

Os valores de cortisol não apresentaram aumento significativo em nenhum dos parâmetros avaliados (fator tempo; grupo ou interação). Lay et al. (1992 a, b) em dois estudos avaliando as marcações a fogo, a nitrogênio e o grupo marcação falsa, observaram um aumento nos níveis de cortisol sérico em gado mestiço e da raça Angus nos três tratamentos, sugerindo que a contenção do animal tenha interferido e se sobreposto à resposta do cortisol à dor, sendo a contenção um estímulo mais potente. Tais achados tentam elucidar o aumento do cortisol no grupo nitrogênio. Porém Lay et al. (1992c), em outro estudo, com vacas de leite, observaram um aumento significativo nas marcações a fogo e a nitrogênio em comparação ao grupo marcação falsa, avaliando a alta concentração de cortisol em ambas marcações.

Corroborando com os nossos achados, Lindegaard et al. (2009) também não obtiveram um aumento significativo do cortisol no momento do fogo, não havendo diferença significativa em relação ao basal (30 minutos antes dos tratamentos) e na introdução do microchip. Ao avaliar o cortisol salivar, Erber et al. (2012b), na marcação a quente e na introdução de microchip em potros, obtiveram como estressante ambos os procedimentos.

O ato da marcação representou tempos diferentes, assim foi somada a frequência de cada acontecimento e dividido pelo número de segundos que durou o evento (Fogo 6s, Nitrogênio 60s). A relação de movimento e repouso dos animais foram, significativamente, maior no grupo fogo em relação ao grupo nitrogênio. O ato da marcação não gerou diferenças significativas no somatório dos acontecimentos por segundo em relação aos movimentos da região da cabeça, corpo, membro anterior esquerdo, e dos movimentos simultâneos do corpo e membros, e quanto à presença da vocalização quando comparados os grupos fogo e nitrogênio. Porém houve uma diferença significativa nos movimentos dos membros por segundo, sendo que houve uma maior movimentação do grupo fogo em relação ao grupo nitrogênio. Observou-se que movimentos de maior intensidade como empinar e coicear com os membros traseiros, foram relatados apenas em animais marcados com fogo, porém foi observado que os animais marcados a frio se incomodavam muito em ficar imóvel. Nas reações comportamentais em bovinos, a marcação a ferro candente provocou significativas reações de fuga, indicativas de dor, em comparação com a marcação a nitrogênio líquido e marcação falsa (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 1998; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN; STOOKEY; WELFORD, 1997).

Em outro estudo similar com vaca de leite, acostumada com contenção, foi observada uma elevada resposta de fuga na marcação a quente em contraposição à marcação a frio, não havendo reação significativa em vacas marcadas com ferro à temperatura normal (LAY, et al; 1992a). Assim pode ser sugerido, que se a manipulação fosse subtraída a marcação a frio poderia ser considerada menos estressante ao animal. Erber et al. (2012b) avaliando os escores de comportamento durante a marcação a fogo e a colocação do microchip não observaram diferenças significativa entre os grupos, atribuindo tal fato a contenção dos animais.

Como sugerido por Erber et al. (2012b), os potros são animais mais susceptíveis ao estresse de manipulação, quando comparados a equinos adultos. No presente experimento os animais marcados a frio ficaram contidos, não podendo se mover, por no mínimo 60 segundos, o que possivelmente gerou maior estresse, não gerando diferença significativa na reatividade entre os grupos de tratamento. Enquanto que a marcação a fogo foi rápida e intensa.

As marcas a fogo não apresentaram queda de pelo, conforme descrito por Lindegaard et

al. (2009), sendo observado um crescimento de pelo e sentido diferente assim como descrito por Caja et al.(2004).

A nitidez da marcação a nitrogênio, utilizando um marcador de liga férrea, não foi capaz de proporcionar melhores qualidades de marcação em comparação com o grupo fogo. Algumas marcações a nitrogênio apresentaram falha na transferência de frio, não aparecendo em sua totalidade em alguns animais, fato devido ao movimentar do animal, fazendo que a pressão da marca fosse diferente em alguns pontos, não sendo possível a elaboração de uma boa identificação em alguns animais. Foram observadas também falhas na nitidez da marcação a nitrogênio, corroborando com nossos achados Farrell 1966 apud (MACPHERSON; PENNER, 1967)também não encontrou a formação de pelos brancos em todas as marcações a nitrogênio, podendo as falhas a ser atribuído a difícil contenção de alguns animais, sendo descrito também por Macpherson e Penner (1967). O tempo utilizado para marcar os animais no grupo nitrogênio ocasionou o aparecimento de pelos pretos em alguns animais, devido ao permanecia de 60 segundos do ferro congelado na pele.

Apesar da experiência de 20 anos do tratador em realizar a identificação a fogo e ter sido treinado e supervisionado para realização da marcação a nitrogênio, foi difícil manter a mesma pressão do ferro frio por 60 segundos na pele do animal devido a movimentação do cavalo. A realização da marcação com aço inox seria melhor devido ao tempo de permanência menor (12 segundos) e a melhor condução térmica do material conforme indicado por Householder et al. (1992). Apesar das dificuldades apresentadas na marcação a nitrogênio os três tratadores, do setor de Equinos da UFRRJ, por unanimidade preferiram a marcação a nitrogênio, pois em suas concepções os animais sofreram menos e proporcionaram feridas superficiais de fácil manejo e cicatrização.

Em suma, o estudo mostra que pequenas modificações no manejo, podem proporcionar uma grande melhora no bem-estar animal.

3.9 Conclusões

- A marcação a fogo e a nitrogênio induziram respostas autonômicas, na HRV, e respostas comportamentais, indicativas de estresse.
- O cortisol não foi um parâmetro suficiente para indicar estresse, pois o estímulo não gerou um aumento significativo entre os tempos basal, 30 e 60 minutos após ambas marcações.
- Os índices de HRV estudados evidenciaram aumento da HR, LF, LF/HF, SDNN, SDNN/RMSSD e diminuição do HF sugerindo ativação autonômica de um predomínio simpático sobre o parassimpático, caracterizando o momento como estressante em ambas marcações.
- O nitrogênio apresentou ser uma melhor opção para realização da marcação por proporcionar menores respostas de estresse, com diminuição dos índices de HR, LF, LF/HF, SDNN e por não apresentar a formação de feridas abertas, obtendo a mesma nitidez da marcação a fogo.
- A marcação com nitrogênio utilizando o marcador de liga férrea não foi eficaz para proporcionar melhores condições de nitidez na marcação. Sendo sugerido que a marcação seja realizada com aço inox, material que proporciona um menor tempo de contenção, e melhor condução do frio, podendo proporcionar melhores resultados.
- No que concerne o bem-estar animal a marcação a fogo deveria ser evitada, sempre que possível, devido ao estresse gerado no momento da marcação, e a formação de feridas, que podem ser intensas e as marcas nem sempre proporcionam uma boa identificação.

CAPÍTULO II:

Efeito da acupuntura nas repostas de estresse induzidas pelo desmame abrupto em potros

4. CAPÍTULO II. EFEITO DA ACUPUNTURA NAS REPOSTAS DE ESTRESSE INDUZIDAS PELO DESMAME ABRUPTO EM POTROS.

4.1 Resumo

O desmame dos equinos é um processo que promove estresse físico e psicológico. Este processo representa ao potro, um afastamento materno, mudanças na alimentação com a privação do leite, alteração de ambiente e manejo, ocasionando ao mesmo tempo, diversas situações novas às quais eles devem se adaptar. O desmame, se não for bem conduzido, pode gerar uma queda de imunidade tornando o animal mais susceptível às doenças. A acupuntura tem sido uma ferramenta da medicina complementar muito utilizada na redução de estresse, e tem como base o princípio de manter ou recuperar a homeostase. Este procedimento visa à prevenção e cura das enfermidades pela aplicação de estímulos através da pele, com a inserção de agulhas em pontos específicos. O objetivo foi avaliar os parâmetros fisiológicos autonômicos (variabilidade da frequência cardíaca (HRV)) e comportamentais dos potros desmamados. Foram utilizados vinte e seis potros da raça mangalarga marchador (M.M.) e mestiços de M. M., provenientes da fazenda da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, divididos em: grupo Controle (n=9), os animais permaneceram, por 20 minutos sem qualquer manipulação; grupo Sham (n=8), denominado acupuntura falsa, foram inseridas agulhas de metal 0.30x40 mm, com a profundidade de 0,2 cm, em locais próximos aos pontos de acupuntura, localizados a uma distância de 2 cm dos pontos VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1, estes locais não foram coincidentes com outros pontos de acupuntura já conhecidos; grupo Acupuntura (n=9), foram inseridas as agulhas de metal 0.30x40 mm, com a profundidade de 0,2 cm nos pontos VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1. No sétimo dia antes do desmame, foram iniciados os tratamentos, que ocorreram em dias alternados. Para realização do desmame foi utilizado o método em grupos, com a presença de uma égua adulta sem parentesco com os potros. O desmame, induziu respostas autonômicas, no HRV, e resposta comportamentais, indicativas de estresse em todos os tratamentos (Controle, Sham e Acupuntura). Nas respostas do HRV, foi observado aumento significativo dos valores da frequência cardíaca (HR), na potência da banda de baixa frequência (LF), na razão LF/HF, no desvio padrão de todos os intervalos RR normais (SDNN), na razão SDNN/RMSSD e diminuição na potência de banda de alta frequência (HF), sem alterações na raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre os intervalos RR normais adjacentes (RMSSD) nos momentos iniciais do desmame, indicando uma ativação simpática, responsável pela elevação dos níveis de estresse nos três grupos de tratamento. Na análise comportamental foi evidenciado a intensificação nos comportamentos indicativos de estresse, como permanecer em alerta, andar, investigar, lambar, relinchar, eliminar e uma diminuição da frequência de repouso e do pastejo, durante a primeira hora do desmame em relação aos demais tempos. A acupuntura realizada no período anterior ao desmame não foi capaz de reduzir o estresse do desmame em nenhum dos parâmetros avaliados. As principais alterações fisiológicas e comportamentais ocorreram entre o momento inicial e a 24ª hora após o desmame, sendo este considerado o período de maior atenção ao potro, com maiores riscos de doenças e acidentes.

Palavras-chaves: cavalo, bem-estar animal, variabilidade da frequência cardíaca.

4. Chapter II. Effect of acupuncture on stress responses induced by abrupt weaning in foals.

4.2 Abstract

Foal weaning equines is a process that promotes physical and psychological stress. This process represents to the foal, a maternal separation, changes in feeding with milk deprivation, alteration of environment and management, causing at the same time, several new situations to which they must adapt. Weaning, if not well conducted, can lead to immunity failure, making the animal more susceptible to diseases. Acupuncture has been a complementary tool to medicine, widely used in stress reduction, and is based on the principle of maintaining or recovering homeostasis. This procedure aims at the prevention and cure of diseases by the application of stimuli through the skin, with the insertion of needles at specific points. The objective was to compare the physiological and behavioral responses of weaned foals. **METHODS:** Twenty - six young horses from the Federal Rural University of Rio de Janeiro farm were divided into: Control group (n = 9), the animals remained, for 20 minutes without any manipulation; Sham group (n = 8), termed as false acupuncture, 0.30x40 mm metal needles with a depth of 0.2 cm were inserted near acupuncture points, located at a distance of 2 cm from the points VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1, these sites did not coincide with other known acupuncture points; Acupuncture group (n = 9), metal needles 0.30x40 mm, with a depth of 0.2 cm were inserted at points VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1. On the seventh day before weaning, treatments were started, which occurred on alternate days. To perform weaning, the method was used in groups, with the presence of an adult mare not related to the foals. Weaning induced autonomic responses in HRV and behavioral response indicative of stress in all treatments (Control, Sham and Acupuncture). HRV responses showed a significant increase in heart rate (HR), low frequency band (LF) power, LF / HF ratio, standard deviation of all normal RR intervals (SDNN), SDNN / RMSSD ratio and decrease in the high frequency band (HF) power, without changes in the square root of the square mean of the differences between adjacent normal RR intervals (RMSSD) at the initial moments of weaning, indicating a sympathetic activation responsible for the elevation of stress levels in the three treatment groups. In the behavioral analysis, it was evidenced the intensification in the behavior indicative of stress, such as staying alert, walking, investigating, licking, neighing, eliminating and a decrease in the frequency of rest and grazing during the first hour of weaning in relation to the others. Acupuncture performed in the pre-weaning period was not able to reduce weaning stress in any of the parameters evaluated. The main physiological and behavioral changes occurred between the first and the 24th hour after weaning time, which is considered the greatest period attention to the foal, with higher risks of illness and accidents.

Key words: horse, animal welfare, heart rate variability.

4.3 Introdução

O desmame é uma prática incondicional, e ocorre em todas as espécies animais, porém este processo pode ocorrer de forma natural ou artificial (WARING, 2003).

O desmame natural nos equídeos é um processo gradual que começa a partir do oitavo mês e seu término depende, principalmente, da condição corporal da égua e seu *status* reprodutivo. As éguas, geralmente, desmamam seus potros antes de completarem um ano de idade, época do próximo parto, porém as matrizes que não conseguiram conceber podem continuar amamentando seus potros até completarem dois anos de idade (CAMERON et al., 2000; DUNCAN; HARVEY; WELLS, 1984; PLUHÁČEK et al., 2007). No desmame natural, haverá interrupção gradativa da ingestão do leite, no entanto, não há quebra do vínculo mãe-prole, podendo este persistir por vários anos em muitos mamíferos (NEWBERRY; SWANSON, 2008), incluindo os cavalos. O vínculo entre mãe e filhos permanece forte até o potro deixar o grupo natal em uma idade que varia de um a quatro anos (KHALIL; KASEDA, 1997; MONARD; DUNCAN, 1996; WARING, 2003).

Em contraste, os potros nascidos de éguas domesticadas são submetidos ao processo de desmame em uma idade muito mais jovem do que os nascidos de matrizes selvagens. As mudanças nutricionais, sociais e ambientais decorrentes do desmame podem ter consequências duradouras para a mãe e para o potro (APTER; HOUSEHOLDER, 1996; HENRY et al., 2012). O desmame de potros na prática agropecuária é, comumente, realizado com a idade de quatro a oito meses (APTER; HOUSEHOLDER, 1996; ROGERS; GEE; FARAM, 2004; WEEKS et al., 2000). A época do desmame em criações de cavalos reflete preocupações opostas para os criadores, podendo ser baseadas nas condições da matriz, resultando em desmame precoce e/ou consequências no desenvolvimento e comportamento dos potros, retardando ou acelerando o processo do desmame (BARTOŠOVÁ et al., 2011).

O desmame é um período de grande estresse para o potro, e pode ter influência negativa sobre o crescimento e consumo de alimentos (WARAN; CLARKE; FARNWORTH, 2008) e até ocasionar um aumento temporário na sua frequência cardíaca (MOONS; LAUGHLIN; ZANELLA, 2005).

A avaliação dos níveis de estresse em potros tem sido baseada em indicadores comportamentais, avaliando a locomoção, vocalização ou comportamentos anormais (HELESKI et al., 2002; HENRY et al., 2012; HOUPTE; HINTZ; BUTLER, 1984), nível de atividade (MCCALL; POTTER; KREIDER, 1985), níveis de cortisol no sangue (BERGER et al., 2013; HOFFMAN et al., 1995; HOUPTE; HINTZ; BUTLER, 1984; MALINOWSKI et al., 1990; MCCALL et al., 1987); níveis de cortisol salivar e variações de peso e crescimento (DUBCOVÁ; BARTOŠOVÁ; KOMÁRKOVÁ, 2015; ERBER et al., 2012 a, b; HENRY et al., 2012; MOONS; LAUGHLIN; ZANELLA, 2005; WULF et al., 2018).

O animal durante o desmame é exposto a diversas situações novas às quais ele deve se adaptar. Geralmente, é introduzido em um ambiente novo, sem a mãe, e seu manejo é intensificado (DUBCOVÁ; BARTOŠOVÁ; KOMÁRKOVÁ, 2015). E como consequência há perda de peso (ERBER et al., 2012a; HENRY et al., 2012); podendo ocorrer ferimentos e, principalmente, queda na imunidade celular tornando o potro mais susceptível a doenças e infecções (FRANCI, 2005).

A quebra do vínculo mãe-prole (seja natural ou forçada), muitas vezes, constitui um evento altamente estressante para ambos, mães e filhos, especialmente durante o período de desmame dos animais domésticos (WEARY; JASPER; HÖTZEL, 2008). Com a necessidade de melhorar o bem estar na criação de animais tem se buscado uma discussão mais aprofundada sobre o processo de desmame, enfatizando a necessidade de estudos sobre a qualidade de vida, através de métodos alternativos de desmame que promovam menores índices de estresse.

A prática de desmame mais disseminada é o desmame abrupto, no qual a égua e o potro

são separados de modo repentino, por distância suficiente para impedi-los de ver, ouvir ou cheirar uns aos outros (APTER; HOUSEHOLDER, 1996; MCCALL; POTTER; KREIDER, 1985; WARAN; CLARKE; FARNWORTH, 2008). Além da falta da mãe e do leite (MCGEE; SMITH, 2004), o processo de desmame abrupto impõe mudanças, incluindo um novo ambiente ou mistura com novos parceiros sociais (NEWBERRY; SWANSON, 2008). Essas mudanças podem provocar vários comportamentos em potros, que pode incluir maior locomoção e vocalização, e comportamento estereotípico ou autodestrutivo podendo persistir como estereotípias durante toda a vida (MCGEE; SMITH, 2004; NICOL et al., 2005a; SARRAHRHI; BLOKHUIS, 2013). Mudanças abruptas, podem ainda aumentar a incidência de problemas de saúde, associados a desvios na curva de crescimento (HOUPY; HINTZ; BUTLER, 1984; ROGERS; GEE; FARAM, 2004).

Dadas estas potenciais repercussões do desmame abrupto, vários métodos alternativos foram submetidos a pesquisas detalhadas (WARAN; CLARKE; FARNWORTH, 2008) incluindo o desmame gradual (ROGERS; GEE; FARAM, 2004), separação parcial permitindo o contato entre as mães e os potros (MCCALL; POTTER; KREIDER, 1985), desmame em pares (HOFFMAN et al., 1995; MALINOWSKI et al., 1990) ou grupos (HELESKI et al., 2002) desmame em piquetes com a possibilidade de pastoreio (HELESKI et al., 2002; NICOL et al., 2005a), desmame com a presença de cavalos adultos sem parentesco (ERBER et al., 2012a; HENRY et al., 2012), e alimentação com diferentes dietas na época do desmame (COLEMAN; MATHISON; BURWASH, 1999; MCCALL; POTTER; KREIDER, 1985; NICOL et al., 2005).

Morel (2003) relacionou quatro diferentes formas de manejo do desmame: abrupta, gradual, em pares e em piquetes. No desmame abrupto separa-se a égua e o potro de forma repentina e não existe contato entre eles após a separação. Para este método é necessário, uma baía segura, sem pontas, em que possam ser fornecidas água fresca de boa qualidade e alimentação adequada. O desmame em pares é realizado de forma abrupta com dois potros da mesma idade em uma mesma baía. O desmame gradual é realizado aumentando o tempo de separação entre o potro e a égua ao longo de semanas. Na primeira semana, recomenda-se meia hora por dia de separação e este tempo vai aumentando, progressivamente, até que ambos passem um dia inteiro separados. É recomendado para este tipo de manejo duas baias com uma janela gradeada entre elas, onde o potro e sua mãe mantenham contato entre si, porém o potro não consegue mamar. Há registros de que o método gradual é menos estressante que o abrupto (MCCALL et al., 1987). Embora pareça ser um bom método, a repetida separação de curto prazo da égua induz nos potros uma maior sensibilidade à separação definitiva (MOONS; LAUGHLIN; ZANELLA, 2005).

O desmame em piquetes não dá para ser executado com apenas um animal ou com animais de idades diferentes. Neste método os potros entram no piquete com suas mães, após um dia é retirada a égua mais dominante ou a mãe do potro mais independente, no outro dia é retirada a égua mais dominante que se encontra no piquete e assim por diante até todas as éguas saírem. As mães são levadas a um local longe o suficiente para os potros não escutarem os chamados das mães. Para diminuir o estresse dos potros, pode ser utilizada uma égua madrinha, que é uma égua mais velha e dócil para manter uma hierarquia e dar segurança (MOREL, 2003)

Para minimizar o estresse e seus efeitos deletérios, é recomendado que se adote um sistema de desmame racional ou planejado, onde as mudanças são lentas e progressivas, permitindo que o potro se adapte à nova condição. A prática de acostumar o potro ao cabresto no período pré desmame, não tem efeito no desempenho de aprendizado no período pós desmame, e também não torna os potros menos medrosos com humanos desconhecidos ou quando submetidos a novos estímulos (MAL et al., 1994). Schmidek et al. (2011) não compartilharam dessa opinião, e seus estudos indicaram que a manipulação de potros ao nascimento de forma gentil três vezes por semana (em dias intercalados) por 15 minutos nas

duas primeiras semanas, facilita o cabrestamento no período da desmama.

Em estudo conduzido por Guirro e colaboradores (2009), onde se avaliou o comportamento exploratório de potros com 25 a 75 dias de vida e de suas mães, mediante a introdução de novos objetos em um piquete após permanência dos potros com suas mães por 30 minutos verificou-se que os potros exibiam maiores frequências de exploração e gastaram maior tempo de investigação na presença dos novos objetos. A aproximação solitária dos potros após prévia aproximação das éguas, provavelmente, ocorria por imitação do comportamento materno ou em decorrência de confiança adquirida pela observação das atitudes delas.

Hoffman et al. (1995), observaram que potros desmamados individualmente, ficaram menos estressados que os desmamados em pares, o que se correlacionou, positivamente, com as dosagens de cortisol sérico e ACTH. Potros desmamados em pares vocalizaram com menor frequência, mas houve uma maior frequência de comportamento agressivo. Potros machos gastaram mais tempo comendo que as fêmeas, não havendo diferença quanto ao sexo nos outros comportamentos. Os autores também observaram que os potros lidam melhor com o estresse quando suplementados previamente com concentrado. Quando desmamados em grupo, onde todas as éguas foram retiradas de uma só vez, os potros eram mais estressados do que aqueles em que as éguas foram retiradas gradualmente. Os resultados indicam que há redução no apetite, no metabolismo e na imunocompetência quando o desmame é realizado de forma brusca e o desmame individual, aparentemente, é menos traumático do que aos pares, e o comportamento de vocalizar, geralmente, está relacionado com estresse.

Segundo Malinowski et al. (1990), o desmame em pares estressa mais os potros quando comparado com o desmame do animal sozinho, sendo comprovado por aumento na concentração plasmática de cortisol e diminuição da resposta imunológica dos animais desmamados em pares.

McCall et al. (1985) concluíram que tanto o desmame gradual como o abrupto provocavam comportamento mais agressivo entre os potros. Nenhum comportamento anormal foi observado no grupo de controle, que consistia de potros mantidos com suas mães. Em outro estudo, McCall et al. (1987) concluíram que a separação abrupta resulta em maior nível de estresse que a separação gradual, com base nos níveis de cortisol.

Haupt et al. (1984) ao avaliarem dois métodos de desmame, observaram que a frequência dos comportamentos de vocalizar, andar, urinar e defecar aumentaram no período pós desmame, indicando estresse. Na análise do cortisol, observaram que houve diferença antes do desmame para depois do desmame, mas não houve diferença entre os animais que foram desmamados sozinhos ou em pares. Entretanto, Turner et al. (2003) ao estudarem os efeitos do desmame gradual e abrupto não observaram diferença significativa nas concentrações de cortisol plasmático e na função imunológica. Concluíram que aparentemente a função imune não é influenciada pelo método de desmame.

Potros desmamados em piquetes apresentavam reação mais calma ao evento estressante do desmame, do que potros desmamados em celeiros (HELESKI et al. 2002; PARKER et al. 2008; NICOL et al. 2005 a).

No período pré desmame, a presença de uma pessoa, próxima à porta da baia, é suficiente para reduzir o comportamento inadequado (agitação, vocalização e traumas contra a parede) quando ocorre separação da mãe. A redução do nível de estresse diminui a probabilidade de desenvolvimento de estereotípias locomotoras, que diminui o valor do animal (MCGEE; SMITH, 2004).

As estereotípias nos equinos podem ser divididas em duas categorias: orais e locomotoras (HOUP; MCDONNELL, 1993; REDBO et al., 1998). A primeira é caracterizada por comportamentos como aerofagia, morder madeira, automutilação, lamber e morder cochos (HOUP; MCDONNELL, 1993) e movimentos variados com a língua (REDBO et al., 1998). Já as estereotípias locomotoras são caracterizadas por movimentos laterais repetitivos, por

andar constante pela baía (MILLS et al., 2002) e por balanço de cabeça (HOUP; MCDONNELL, 1993).

O confinamento após o desmame foi associado a uma elevação no risco de estereotípias quando comparado com o desmame em piquetes (WATERS et al., 2002). Em cavalos selvagens, não há observação de comportamento anormal, enquanto estereotípias estão presentes em mais de 15% dos cavalos domesticados (LUESCHER et al., 1991).

As estereotípias orais estão, comumente, relacionadas com a dieta e restrição do comportamento de pastejo. Em estudo realizado por Waters et al. (2002), foi demonstrado que o desmame e o comportamento da mãe tem influência no desenvolvimento de aerofagia, principalmente, quando o desmame é realizado em baía ou em estábulo. Potros de éguas dominantes têm uma incidência maior de problemas comportamentais, quando comparados com potros de éguas com comportamento mais submisso e 74% dos potros que desenvolveram aerofagia, antes apresentaram o hábito de roer madeira. É sugerido que, em um ambiente aberto, especialmente, com outros animais, os potros apresentem uma maior variedade de comportamentos, que potros desmamados em baias não teriam a oportunidade de expressar, diminuindo a chance do desenvolvimento de estereotípias.

Em estudo conduzido por Nicol et al. (2005b), observaram que 18 potros, dos 186 potros estudados, desenvolveram estereotípia oral antes do desmame. Destes, nove desenvolveram aerofagia e hábito de roer madeira, sete mastigavam madeira e dois faziam aerofagia. Após serem desmamados, 42 potros desenvolveram estereotípias orais, sendo mais comum o hábito de roer madeira e/ou aerofagia. Os potros que desenvolveram estereotípias orais antes do desmame continuaram a apresentar este comportamento após o desmame. Potros filhos de éguas submissas apresentaram maior quantidade de comportamento social, gastando um maior tempo praticando este ato e recebendo quando comparados com potros de éguas dominantes.

A alimentação também influencia no estresse. Potros desmamados que receberam dieta rica em fibra e óleo sofreram menos estresse quando comparados com os que receberam dieta rica em amido e açúcares. Porém o estresse é manifestado de forma diferente conforme o método de desmame. Quando o desmame foi feito em estábulos, os potros que consumiram dieta rica em óleo e fibra apresentaram menor atividade locomotora que os potros que consumiram dieta rica em amido e açúcares. Quando realizado em piquete os animais que receberam alimentos ricos em óleos e fibras, ficaram menos tempo em alerta e permaneceram mais tempo pastando que os animais que receberam alimentos ricos em amido e açúcares. Contudo ambos os grupos de potros apresentaram uma curva de crescimento similar até os dois anos de vida, independentemente do evento estressante (NICOL et al. 2005a).

Comparando os diferentes métodos de desmame, McCall et al. (1987) verificaram que, na primeira semana pós desmame, os potros que sofreram separação total e abrupta com *creep feeding* no período pré desmame, tiveram consumo menor de alimento quando comparado com os outros grupos que sofreram separação total sem *creep feeding*. Após a primeira semana, o consumo se igualou entre os grupos. No período pré desmame, potros que tiveram *creep feeding*, ganharam mais peso que os sem *creep feeding* e no período pós desmame não houve diferença de ganho de peso entre os grupos. Potros desmamados de forma abrupta e total exibiram concentrações mais altas de cortisol, além de sinais emocionais (vocalização e aumento da atividade) que os manejados de forma mais intensiva e desmamados de forma gradual.

Avaliando o comportamento alimentar de potros da raça Mangalarga Marchador sob confinamento noturno com ofertas de alimento, Dittrich et al. (2010) observaram que potros confinados consumiram forragem por mais tempo no período da tarde em comparação ao período da manhã. Em animais alimentados somente com volumoso, o tempo diário de pastejo foi superior durante a noite, em relação à madrugada (00h00min às 06h00min) e de manhã (06h00min às 12h00min).

O sexo do potro parece estar relacionado a um nível maior ou menor de estresse. Moons; Laughlin; Zanella (2005) observaram maiores parâmetros de estresse (cortisol salivar, atividade locomotora e tempo deitado) em potras em comparação aos potros. Wulf et al. (2018) observaram no desmame abrupto uma diminuição do peso e aumento do cortisol salivar em fêmeas, maior vocalização e defecação em machos, não sendo encontradas diferenças entre o sexo na análise da HRV no período pós desmame.

O desmame, se não for bem conduzido, pode gerar uma queda de imunidade tornando o animal mais susceptível a doenças e infecções (HOFFMAN et al., 1995). A acupuntura é amplamente utilizada em casos de alterações comportamentais e físicas decorrentes do estresse em humanos e animais. A acupuntura proporciona o alívio de tensão muscular, melhora do fluxo sanguíneo local, controla a dor e modulação do sistema nervoso autônomo (BARLAS et al., 2000; KNARDAHL et al., 1998). As investigações científicas ocidentais sobre os mecanismos e a eficácia dessa terapia em equinos ainda são escassas (RIZZO et al., 2017). Com base na hipótese de que estimulação de pontos a acupuntura pode melhorar as respostas de estresse e, conseqüentemente, melhorar a adaptação do organismo nessas situações e dessa forma poder proporcionar melhor recuperação da homeostase do organismo após o desmame.

Mudanças nos padrões da HRV fornecem um indicador de comprometimento da homeostase/equilíbrio (VANDERLEI et al., 2009). Representando um dos mais promissores marcadores quantitativos do balanço autônomo. Para evitar esta situação, é necessário aprofundar os conhecimentos sobre os processos fisiológicos que desencadeiam o estresse do desmame. Na tentativa de reduzir o efeito deletério deste estresse, o presente estudo realizou sessões de acupuntura antes do desmame dos potros da UFRRJ.

A hipótese do presente projeto baseia-se na utilização da acupuntura como uma ferramenta capaz de reduzir o estresse do desmame, para isso será avaliado o efeito da acupuntura na Variabilidade de Frequência Cardíaca, no Cortisol Sérico e Fecal e a análise comportamental dos potros durante o processo de desmame.

4.4 Justificativa

O desmame dos potros é realizado a partir dos seis meses de idade, nos equinos da UFRRJ. A prática do desmame é considerada um estresse de longa duração. A fim de reduzir o estresse do desmame, foi proposto a utilização da acupuntura, como uma ferramenta preventiva, reequilibrando o organismo do animal, gerando melhores condições para ele superar a fase do desmame.

A acupuntura tem sido peça fundamental para obtenção do bem-estar animal e prevenção de doenças, sendo de extrema relevância, o estudo das respostas fisiológicas dos potros tratados com acupuntura anteriormente a situação do estresse do desmame.

4.5 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da acupuntura nas respostas fisiológicas de potros submetidos a estresse do desmame.

4.5.1 Objetivos específicos

- Estudar as alterações fisiológicas através da Frequência Cardíaca, Variabilidade da Frequência Cardíaca, do Cortisol Sérico, antes e após o desmame abrupto em

- piquetes, com a presença de uma égua madrinha, nos potros com 24 a 32 semanas de idade.
- Correlacionar o efeito da estimulação dos pontos de acupuntura VG1, VG16, Bai Hui, B23, B49 e B52 na Variabilidade de Frequência Cardíaca, no Cortisol Sérico e, após o desmame abrupto em piquetes, com a presença de uma égua madrinha, nos potros com 24 a 32 semanas de idade.
 - Estudar as alterações comportamentais de potros com 24 a 32 semanas de idade, decorrentes do desmame abrupto em piquetes, com a presença de uma égua madrinha, correlacionando com a Variabilidade de Frequência Cardíaca, Cortisol Sérico e Fecal.

4.6 Material e Métodos

O estudo foi aprovado pela comissão de ética e bem-estar do Instituto de Veterinária, UFRRJ, de acordo com o protocolo nº9316020517 (Anexo B).

Foram utilizados 26 potros, 17 da raça Mangalarga Marchador e 9 mestiços de Mangalarga Marchador, com idade variando entre 24 a 32 semanas, sendo 16 fêmeas e 10 machos. Os animais pertenciam ao Setor de Equinocultura da UFRRJ, sendo este composto por duas instalações: o galpão das matrizes e o galpão dos garanhões.

Todos os potros nasceram e foram criados nas mesmas condições, estando adaptados aos pastos e as instalações do galpão das matrizes. Não havia sistema de *creep feeding* para suplementação alimentar dos potros no período da amamentação. Os potros se alimentavam do concentrado farelado (composto por farelo de milho, soja, óleo, premix, sal), juntamente, com a mãe nas baias individuais externas, localizadas nas matrizes. Os potros foram, semanalmente, manipulados, medidos e pesados, com a utilização de fita de peso, específica para uso em equinos, estando os mesmos adaptados à presença e ao contato com o ser humano.

Os potros, após o desmame, foram acondicionados nas instalações disponíveis no galpão dos garanhões, e as éguas mudaram para outro pasto pertencente ao galpão das matrizes, estando estes alojamentos a uma distância aproximada de 800 metros entre si, com a presença de prédios no percurso, impossibilitando o contato visual entre a mãe e o filhote recém desmamado.

O local onde os potros foram alojados durante o processo de desmame, tratava-se de um piquete ao ar livre, com dimensões de aproximadamente 4.000 m², com cobertura vegetal de grama batatais (*Paspalum notatum*), contendo árvores com áreas de sombra, um bebedouro com água potável, e oito cochos plásticos, presos a um tronco de árvore, onde eram administrados os concentrados e feno peletizado, para cada potro.

Os animais foram suplementados com feno de tifton, com disponibilidade diária de um fardo para cada 500 kg de peso vivo, um quilo de concentrado farelado (composto por farelo de milho, soja, óleo, premix, sal) e um quilo de feno de alfafa peletizado, duas vezes ao dia, sendo uma suplementação no período da manhã e outra à tarde. Os desmames ocorreram nos meses de junho, agosto e setembro, e sempre com a presença de um animal adulto sem parentesco com os potros, denominado égua madrinha.

Os potros permaneceram no piquete por 15 dias, durante o processo de desmame, e no término deste período, os potros e a égua madrinha retornaram ao pasto de origem, pertencente ao galpão das matrizes.

Os potros foram aleatoriamente divididos e submetidos a três tipos de tratamento:

1. Controle (Cont): os animais permaneceram apenas com cabrestos por vinte minutos sem qualquer manipulação.

2. Acupuntura não ponto (Sham): os animais permaneceram por 20 minutos com a

agulhas para acupuntura (0.30x40 mm) inseridas na pele, na profundidade de 0,2 cm, em regiões denominadas não pontos, sendo estas localizadas a uma distância de 2 cm dos pontos de acupuntura: VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1.

3.Acupuntura (Acup): os animais permaneceram por 20 minutos com a agulhas para acupuntura (0.30x40 mm) inseridas na pele, na profundidade de 0,2 cm, nas regiões dos pontos de acupuntura: VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1.

4.6.1 Protocolo experimental :

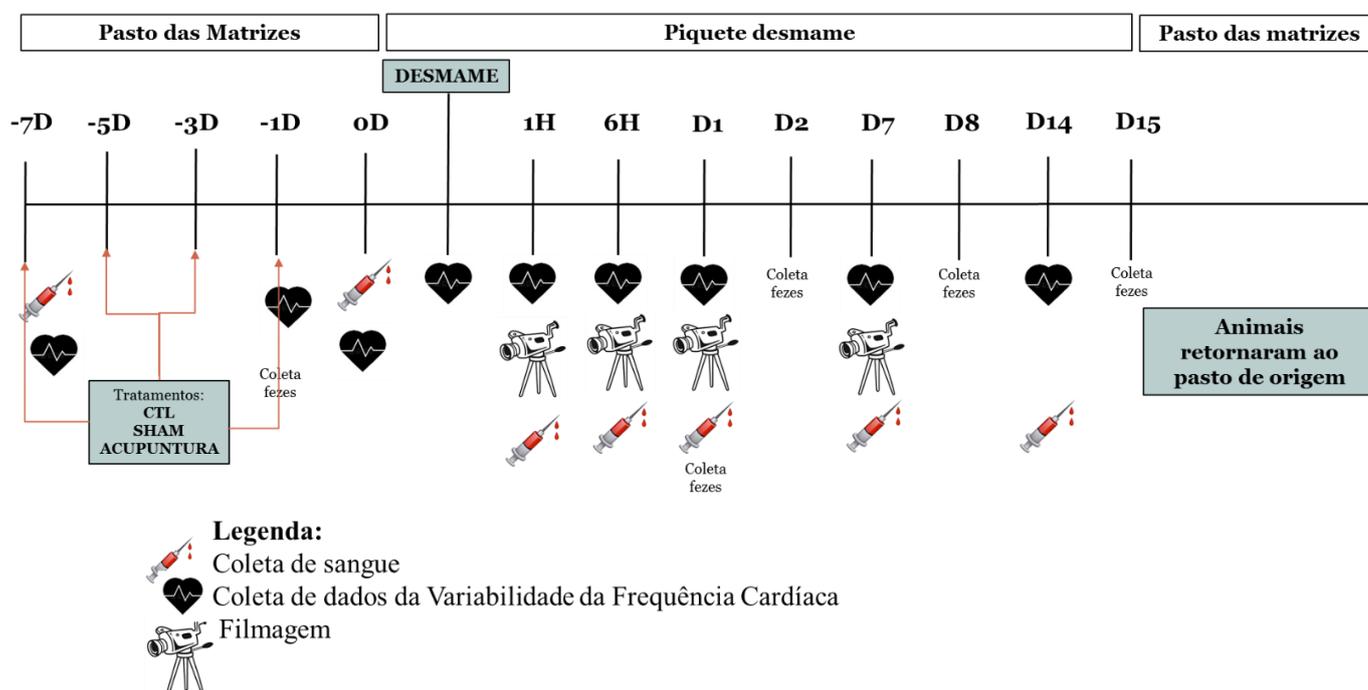


Figura 15: Ilustração esquemática do protocolo experimental.

Os tratamentos foram realizados em dias alternados, conforme a distribuição prévia dos grupos e potros, e seu início deu-se setes dias antes do processo do desmame. Nos dias de tratamentos os animais foram apartados no pasto como de costume e foram alojados nas baias externas com as respectivas mães, o potro foi contido com a utilização de cabresto.

No primeiro (-7D) e no último (-1D) dia de tratamento foram realizadas coletas de sangue, e as fitas cardíacas Polar Equine® colocadas para a aferição da HRV, durante todo o procedimento. Nos demais dias de tratamento foram realizadas apenas a contenção com cabresto. Nos dias -7D e -1D, os tratamentos foram iniciados, após 20 minutos de ativação das fitas cardíacas, e após o término do tratamento, os potros permaneceram por mais 20 minutos com as fitas. No dia -1D, foi realizada a coleta de fezes, após 20 minutos do término do tratamento, os potros foram conduzidos com as mães ao tronco de contenção dupla, dentro do galpão das matrizes. No tronco, foi realizada a coleta de fezes diretamente da ampola retal dos potros, com a utilização de uma luva de látex descartável, embebida com vaselina líquida, as fezes coletadas foram armazenadas, imediatamente, em pote próprio e congeladas para posterior análise de cortisol fecal.

Todos os dias após os procedimentos que envolviam os tratamentos e suas análises, os potros foram suplementados com o concentrado de costume e retornaram ao pasto de origem juntamente com as mães.

O dia do desmame foi dividido em três momentos: momentos que antecederam o desmame (0D), momento da primeira hora do desmame (1H) e momento que compreende a sexta hora após o desmame (6H).

No momento que antecedeu o desmame (0D), os animais foram apartados no pasto, e alojados nas baias externas juntamente com as mães. Cada potro foi contido pelo cabresto, e assim, permaneceram até a separação da mãe. Foi realizada a coleta de sangue para análise basal do cortisol sérico, e foi colocado no tórax a fita cardíaca Polar Equine®. Após vinte minutos, os potros, as mães e a égua madrinha foram conduzidos a pé para o piquete desmame, localizado nas instalações do galpão dos garanhões. Todos entraram no piquete desmame, foram retirados os cabrestos dos potros, e realizado o desligamento e reativação do relógio RS 800 que capta os dados da fita cardíaca Polar Equine®. Após todos os potros estarem sem o cabresto, ocorreu a saída das éguas, uma após a outra, em sequência, permanecendo no piquete a égua madrinha e os animais a serem desmamados. Neste momento, iniciou o processo de desmame propriamente dito.



Figura 16: Fotografia do piquete desmame. Potros no momento 1H e a égua madrinha esquerda.

O momento da primeira hora do desmame (1H), foi subdividido em três fases: fase dos primeiros cinco minutos do desmame (D5min), fase dos 25 minutos após o desmame (D25 min), a fase dos 45 minutos após o desmame (D45min), estas fases foram utilizadas para avaliação da HRV, gravada pelo frequencímetro, disposto no tórax dos animais, como informado anteriormente.

Após a retirada das éguas, os potros permaneceram no piquete por 50 minutos, denominado momento 1H. Na filmagem do comportamento utilizada uma máquina fotográfica Canon®, no modo de filmagem, com auxílio de um tripé, e sem a presença humana, para não influenciar o comportamento. No término dos 50 minutos os potros foram retirados do piquete acompanhados pela égua madrinha e alojados em uma baia fechada, dentro do galpão dos garanhões. Um potro por vez, contido pelo cabresto, e acompanhado da égua madrinha, foi conduzido para o tronco de contenção individual, no hall do galpão dos garanhões. Imediatamente após a entrada no tronco, foi realizada a coleta de sangue no momento (1H), e desligado o relógio RS 800 e retirada a fita cardíaca Polar Equine®. Após esses procedimentos, os animais foram alojados em outra baia fechada. Após o término da coleta de sangue de todos os animais, estes foram conduzidos livremente ao piquete de desmame, acompanhados pela égua madrinha, que foi conduzida pelo cabresto. Após entrarem no piquete, os animais

receberam a suplementação alimentar como descrita anteriormente.

Nos demais momentos avaliados (6H, D1, D7, D14) os potros foram retirados do piquete, sempre acompanhados da égua madrinha, e conduzidos para as baias fechadas. E, um a um, foram contidos pelo cabresto e levados para o tronco de contenção individual, acompanhando a égua madrinha. Imediatamente após a entrada no tronco, foi realizada a colocação da fita cardíaca Polar Equine® com ativação do relógio RS800. Após esse procedimento, os animais foram acondicionados em outra baia fechada. Ao término da colocação e ativação do frequencímetro, estes foram conduzidos, livremente, ao piquete de desmame, acompanhando a égua madrinha, que estava sendo conduzida no cabresto. Após entrarem no piquete, foram realizados os mesmos procedimentos descritos no momento 1H, logo após a saída das éguas. No momento D1, foi realizado também coleta de fezes, após a coleta de sangue, antes dos potros serem retirados do tronco de contenção.

No segundo (D2), oitavo (D8) e décimo quinto dia (D15) após o desmame, os potros foram retirados do piquete com a égua madrinha e alojados numa baia fechada. E, um a um, foram contidos pelo cabresto e levados para o tronco de contenção individual, com a égua madrinha. Imediatamente após a entrada no tronco, foi realizada a coleta de fezes diretamente da ampola retal, como descrito anteriormente, e os animais foram fotografados, pesados e medidos. Após esses procedimentos, os animais foram alojados em outra baia fechada. Ao término dos procedimentos, em todos os animais, estes foram conduzidos, livremente, ao piquete de desmame, com égua madrinha, que estava sendo conduzida no cabresto. Após entrarem no piquete, os animais receberam a suplementação alimentar como descrita anteriormente.



Figura 17: Alimentação dos animais durante o desmame

No décimo quinto dia (D15), após a alimentação, os potros e a égua madrinha foram conduzidos a pé ao pasto de origem, no galpão das matrizes.

4.6.2 Características do ponto de acupuntura segundo a Medicina Tradicional Chinesa (MTC).

Foram utilizados pontos de acupuntura, também chamados de acupontos, (VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1) que permaneceram no animal por 20 minutos com objetivo de diminuir o medo e a ansiedade pela ausência da mãe, e proporcionar calma aos animais (**Quadro 2**). Os pontos foram escolhidos por suas funções na MTC, e pela localização dos mesmos. Os potros, por serem animais pouco manejados, não respondiam bem a manipulação da cabeça e membros, sendo escolhidos os pontos em sua maioria na região do dorso-lombo (Figura 18).

No grupo acupuntura falsa, foram colocados os pontos a cerca de 2 cm da localização dos pontos, sem coincidir com outros pontos de acupuntura coincidentes, representados pela figura (Figura 18).

Quadro 2: Localização e descrição dos acupontos, adaptados de Maciocia, (2007); Schoen (2006).

Acuponto	Localização	Substrato Anatômico	Indicação MTC
VG1 (HouHai) Mar de Trás	Ponto médio entre a cauda e o ânus, na prega anocaudal.	Área rica em tecido conjuntivo frouxo, inervada pelos ramos ventrais dos nervos sacral e coccígeo, originados no plexo lombossacral. Nervos sensitivos e motore	Nervosismo, agitação e acalma a mente Alterações na porção final do intestino grosso.
VG16 (Tian Men) Portão Celestial	Na linha média dorsal, numa depressão entre as protuberâncias occipitais, na base das orelhas, sobre a articulação atlantoccipital	Ramos do terceiro nervo cervical e do nervo grande occipital.	Dispersa o vento frio Ilumina o espírito Drena o fogo.
B23 (Shenshu – Shu do Rim)	A 3 cun (1 cun corresponde a largura da costela do cavalo) lateralmente a linha média, entre a segunda e terceira vértebras lombares, dorsal ao aspecto caudal da última costela.	Ramo cutâneo dorsal do nervo lombar.	Tonifica a Yin do Rim. Fortalece o cérebro e a medula. Beneficia a mente.
B49 Yishe (Residência do Intelecto)	Localizado a 6 cun (1 cun corresponde a largura da costela do equino) à linha média dorsal, na altura do décimo sétimo espaço intercostal.	Ramo cutâneo dorsal do nervo torácico.	Acalma a preocupação e a obsessão no caso do desequilíbrio da terra. Este ponto tonifica o aspecto mental do Baço, melhora a capacidade de aprendizagem.
B52 (Zhishi) Morada da Vontade	Localizado a 6 cun (1 cun corresponde a largura da costela do equino) lateralmente a linha média, entre a segunda e terceira vértebras lombares, dorsal ao aspecto caudal da última costela.	Ramificações dorsais do segundo nervo lombar	Tonifica a Essência, beneficia a região lombar. Controla o medo. Reforça a vontade.
Bai Hui	Na depressão entre os processos espinhais da última vértebra lombar e a primeira vértebra sacral, ponto único. Espaço lombo sacral.	Ramo dorsal do último nervo lombar.	Ascende o Qi límpido e clareio o espírito. Nutre o cérebro e acalma a mente.

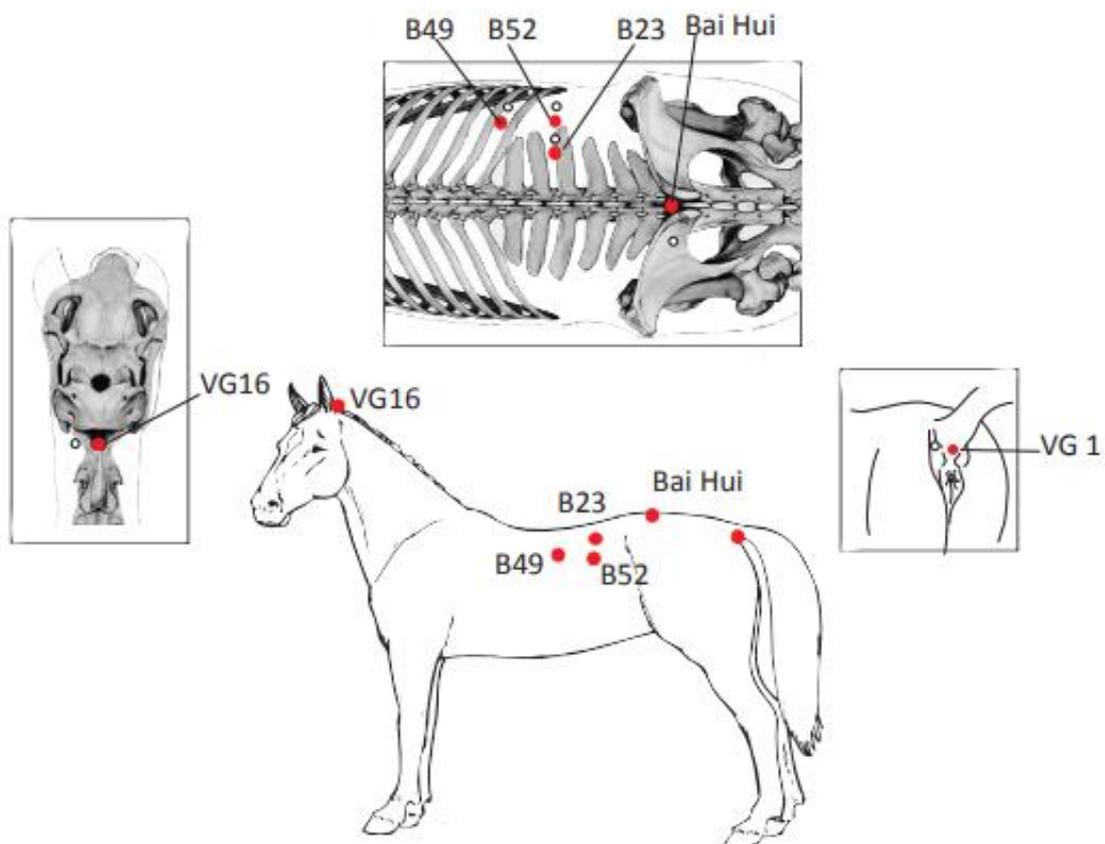


Figura 18: Esboço do corpo do cavalo mostrando as localizações dos pontos de acupuntura (círculos vermelhos) e não pontos/sham (círculos abertos). VG: Vaso Governador, B: Bexiga



Figura 19: Aplicação de agulha em um animal do grupo acupuntura durante o tratamento pré-desmame.

4.6.3 Frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca.

Os intervalos RR dos animais foram registrados por um frequencímetro, RS 800 (Polar Equine®) com descrito no capítulo primeiro. O transmissor do sistema capta os sinais e envia-os para o relógio do equipamento, que armazena estes dados. Os dados armazenados no relógio foram enviados para o programa Polar Pro Trainer Equine® por meio da interface de emissão de infravermelhos, para realizar a análise espectral da HRV.

A avaliação dos índices da variabilidade da frequência cardíaca (HRV), no domínio da frequência e no domínio do tempo, foram analisados em 22 animais (Controle n=8, Sham n=7 e Acupuntura n=7), sendo retirados os animais que apresentaram um erro acima de 5 % na captação dos dados. Sendo avaliados os segmentos de intervalos RR, correspondentes a 300 segundos nos momentos: -7 D (7 dias antes do desmame), -1D (1 dia antes do desmame), 0D (aproximadamente uma hora antes do desmame), D5min (os primeiros cinco minutos do desmame), D25 min (20-25 min após o desmame), D45min (40-45 minutos após o desmame), D 6h (6 horas após o desmame), D 24h (24 horas após o desmame), 7D (7 dias após o desmame) e 14D (14 dias após o desmame).

4.6.4 Análise do comportamento

Para realização da análise comportamental, foram avaliados os primeiros 20 minutos dos de gravação no piquete nos momentos (1H, 6H, D1).

Nas gravações, foi utilizada uma máquina fotográfica Canon® e uma Nikon®, no modo de filmagem, com auxílio de um tripé, sem interferência humana, não influenciando no comportamento gravado. Porém as máquinas gravam apenas 20 minutos seguidos, sendo necessário as trocas das máquinas por um colaborador, na troca das máquinas observou-se alteração do comportamento do potro. A fim de evitar esta interferência, foram escolhidos os primeiros 20 minutos para análise comportamental.

Os comportamentos foram avaliados quanto à frequência (número de ocorrências) e quanto ao tempo de duração (em segundos), de acordo com o Quadro 3.

Quadro 3: Análise Comportamental do desmame, adaptada de Nicol et al. (2005a).

	Comportamento pós desmame	
Frequência n° X	Contato Social	Agressão
		Interação Social
	Atividade	Investigar
		Tentativa de Mamar
		Lamber o coxo
		Movimento de cavar
		Eliminação
		Relinchar
Duração (segundos)	Atividade	Deitar
		Repousar
		Permanecer em alerta
		Passo
		Marcha e/ou Cânter
		Alimentação

Cada comportamento avaliado no Quadro 3 foi classificado de acordo com a Tabela 8. Alguns comportamentos são ilustrados nas figuras 20 e 21.

Tabela 8: Descrição dos comportamentos avaliados, adaptado de Nicol et al.(2005a).

Classificação	Descrição
Agressão	Cavalo apresenta comportamentos agressivos.
Passo	Andamento natural, a quatro tempos, marcado pela progressão de cada par lateral dos membros, andando pelo piquete sem estar pastando.
Alerta	Ficar atento com a cabeça e pescoço levantados, olhos arregalados e orelhas em pé ou móveis.
Deitar	Ficar deitado em decúbito lateral ou em decúbito esternal.
Eliminação	Ato de esvaziamento do líquido da bexiga (micção) e/ou liberação das fezes presente na ampola retal (defecação).
Interação Social	Cavalo realiza mordiscos em regiões de outros cavalos, sem objetivo de agressão.
Investigar	Cavalo estende o pescoço para a parte do meio ambiente e olha cheira um objeto.
Tentativa de mamar	Animal posiciona a cabeça na região inguinal de outro animal e realiza tentativas de sugar, mimetizando o ato de mamar.
Marcha e/ou Cânter	Marcha: Andamento natural, simétrico, a quatro tempos, com apoio alternado dos bípedes laterais e diagonais, intercalados por momentos de tríplice apoio. Cânter: andamento a três tempos, em que o cavalo avança a perna direita quando vira para direita e vice-versa.
Repousar	Ficar distraído, com a cabeça e pescoço abaixados, olhos parcialmente ou completamente fechados e as orelhas relaxadas, sem estar em decúbito.
Alimentação	Ingestão de grama ou feno, em estação ou andando.
Relinchar	Emitir som curto através da laringe, com objetivo de comunicação.

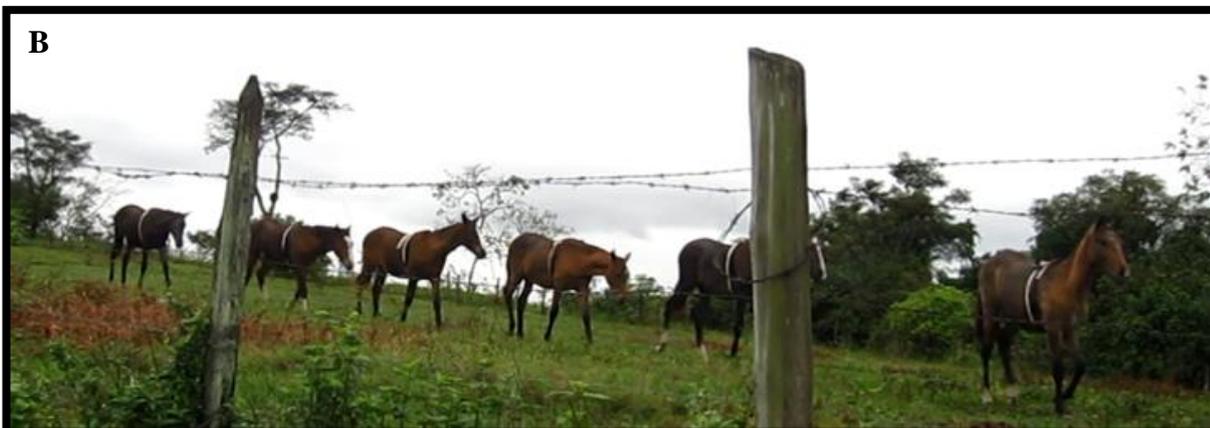
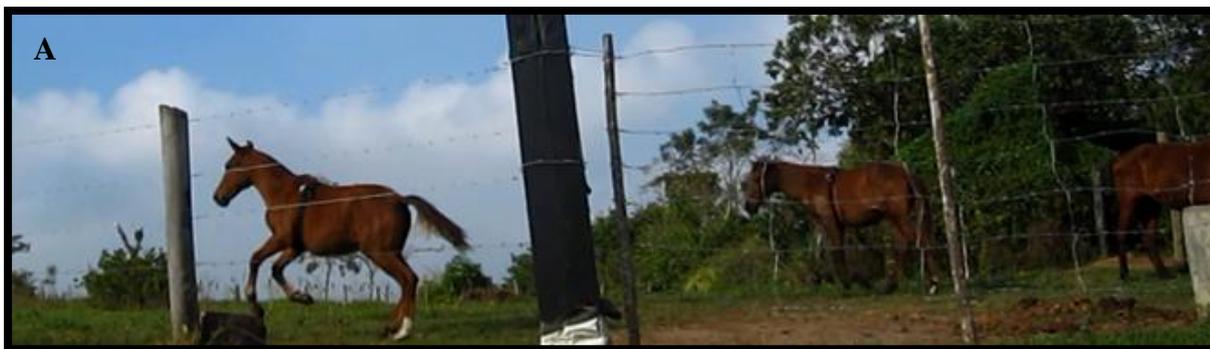


Figura 20: Fotografia do comportamento apurado, conforme a duração em segundos. (A): Animais apresentando a atividade de andar. (B): Animal da esquerda apresentando o comportamento de alerta, enquanto os animais da direita estão realizando o comportamento de alimentação. (C): Animal da esquerda apresentando cânter, e o animal na direita em repouso. (D) Animal deitado.

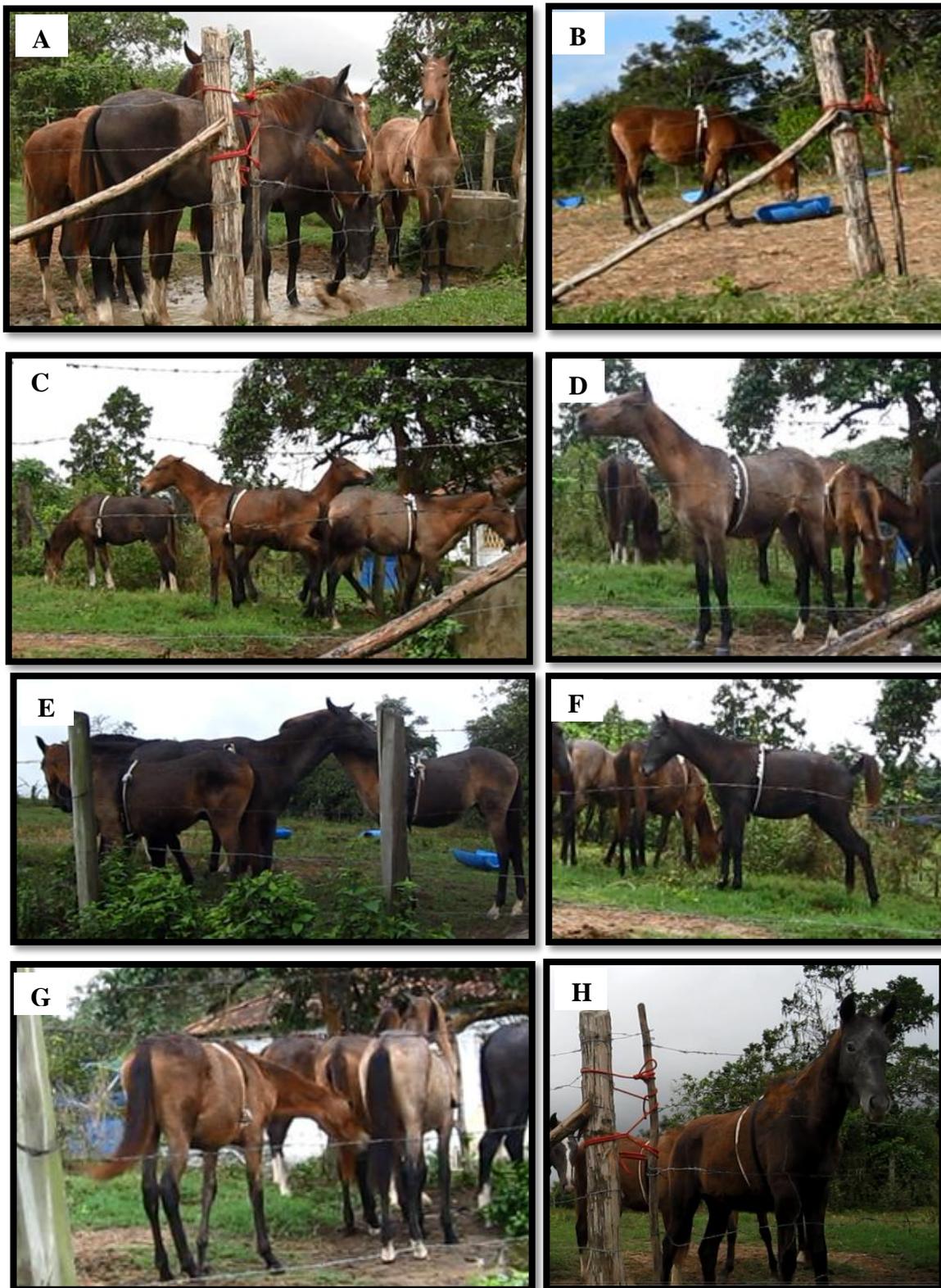


Figura 21: Fotografia do comportamento apurado em número de acontecimentos. (A): Animais apresentando a atividade de cavar na água com o membro anterior esquerdo. (B): Atividade de lamber o coxo. (C): Comportamento antissocial. (D): Atividade de relinchar. (E): Interação social. (F): Eliminação. (G): Tentativa de mamar. (H): Investigar com a cabeça para fora da cerca.

4.6.5 Análise do cortisol sérico e fecal

Para avaliação dos parâmetros fisiológicos endócrinos, foram realizadas coletas de sangue para análise de cortisol sérico e fezes para análise do cortisol fecal.

O sangue foi coletado, diretamente, da veia jugular, através da utilização de uma agulha estéril descartável (25x0,8mm) para coleta com tubo a vácuo sem anticoagulante (10ml), com ativador de soro.

Após cada coleta, os tubos foram identificados e armazenados no isopor com gelo e, após o término do experimento, as amostras foram centrifugadas no laboratório de Ciências Fisiológicas da UFRRJ, na velocidade 3000 RPM por 20 minutos e os soros armazenados em duplicatas, num Ependorf® de 1,5 mL, e foram identificados e estocados em freezer a -20°C.

As fezes foram coletadas, diretamente, da ampola retal dos potros, com a utilização de uma luva de látex descartável e embebida com vaselina líquida, sendo as fezes coletadas e colocadas imediatamente em pote próprio e congeladas no freezer a -20°C, para posterior análise do cortisol fecal.

4.6.6 Estatística

Os resultados dos parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca foram avaliados pelo teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas, quando significativas foram comparadas pelo Teste de Tukey. Os valores obtidos pela análise comportamental foram avaliados pelo teste ANOVA de duas vias para medidas não repetidas, e quando significativas foram comparadas pelo Teste de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas utilizando intervalo de confiança de 95% e probabilidade de 5%. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os gráficos foram construídos usando GraphPad Prism 5.0® (Software GraphPad).

4.7 Resultados

4.7.1 Frequência cardíaca e variabilidade da frequência cardíaca

O desmame aumentou a frequência cardíaca nos três grupos: CTL, SHAM, ACUP; (Anova de duas-vias, fator tempo, $F_{(9, 171)} = 16,23$, $p < 0,0001$), sem diferença significativa nos fatores grupo ($F_{(2, 19)} = 0,9238$, $p = 0,4141$) nem na interação tempo x grupo ($F_{(18, 171)} = 0,5178$, $p = 0,9472$) (Figura 22 D). Através do pós-teste de Tukey, foi observado o aumento da frequência cardíaca no período de D5min, D25 min, D45 min ($p < 0,05$) em comparação aos momentos basais (-7D, -1 e 0) e posteriores ao desmame (24h, 7D e 14D). Seis horas após ao desmame, a HR ainda não voltou aos níveis basais (apresenta diferença significativa em relação aos momentos basais -7D, -1 e 0 e posteriores ao desmame 7D e 14D, mas não é diferente de 24h). Vinte e quatro horas após ao desmame a HR retornou aos níveis basais, onde os tempos 24h, 7D e 14D após ao desmame não diferem dos momentos basais.

Ao avaliar a HRV no domínio da frequência foi observado que o desmame aumentou a razão LF/HF independente do grupo (fator Tempo $F_{(9, 171)} = 11,28$, $p < 0,0001$), sem diferença significativa nos fatores grupo ($F_{(2, 19)} = 2,231$, $p = 0,1348$) e interação ($F_{(18, 171)} = 1,326$, $p = 0,1771$) (Figura 22 A). Os maiores valores de LF/HF foram observados nos momentos D5 min e D 25 min em relação aos demais momentos avaliados (sendo significativamente diferentes de -7D, -1 e 0, 6h, 24h, 7D e 14D, Teste de Tukey $p < 0,05$). O momento de D6h e D24h diferem também do momento 14D. O momento D45min apresentou valores intermediários, sendo diferente de -7D, 7D e 14D.

Da mesma forma, na análise dos componentes de baixa (LF) o desmame aumentou a LF em ambos os grupos (fator Tempo $F_{(9, 171)} = 5,918$, $p < 0,0001$), não havendo diferença significativa nos fatores Interação ($F_{(18, 171)} = 1,491$, $p = 0,0983$) e Grupo ($F_{(2, 19)} = 0,6972$, $p = 0,5103$) (Figura 22 B). Na análise dos componentes de alta frequência (HF) o desmame diminuiu o HF em ambos os grupos (fator Tempo $F_{(9, 171)} = 5,856$, $p < 0,0001$), não houve diferença significativa nos fatores Interação ($F_{(18, 171)} = 1,491$, $p = 0,0982$) e Grupo ($F_{(2, 19)} = 0,7605$, $p = 0,4811$) (Figura 22 C). Os maiores valores de LF e os menores de HF foram observados nos momentos D5 min e D 25 min em relação ao momento -7D, 7D e 14D (Teste de Tukey $p < 0,05$). O tempo 14D pós desmame, além de ser diferente dos tempos D5min e D25min, também foi diferente dos tempos D45min, D6h e D24h (tanto para LF quanto para HF).

Os parâmetros de HRV no domínio do tempo indicaram que o SDNN, aumentou em todos os grupos (fator Tempo $F_{(9, 171)} = 7,948$, $p < 0,0001$), porém não foram observadas diferenças significativas nos fatores grupo ($F_{(2, 19)} = 0,5135$, $p = 0,6065$) e interação ($F_{(18, 171)} = 0,5983$, $p = 0,8975$) (Figura 22 F). Os maiores valores de SDNN foram observados nos momentos D5 min e D 25 min em relação aos momentos anteriores ao desmame (-7D, -1D) e posteriores (7D e 14D). O tempo D5min também diferiu do momento basal (0D) e posterior (D24h). O tempo 14D pós desmame, além de ser diferente dos tempos D5min e D25min, também foi diferente dos tempos D45min e D6h. O tempo D45m também diferiu do momento basal (-1D) (Teste de Tukey $p < 0,05$).

Na análise da RMSSD, não foi detectada diferença significativa em nenhum dos fatores analisados: Tempo ($F_{(9, 171)} = 0,6215$, $p = 0,7777$), grupos ($F_{(2, 19)} = 0,2659$, $p = 0,7694$) e interação ($F_{(18, 171)} = 1,054$, $p = 0,4036$). (Figura 22 E).

A análise da razão SDNN/RMSSD, demonstrou que o desmame foi capaz de aumentar SDNN/RMSSD (fator Tempo ($F_{(9, 171)} = 8,487$, $p < 0,0001$), porém não possível observar diferença significativa no fator Grupo ($F_{(2, 19)} = 0,6150$, $p = 0,5511$) na interação do grupo e tempo ($F_{(18, 171)} = 0,6190$, $p = 0,8816$). Através do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$), foi observado um aumento da razão SDNN/RMSSD no período de D5min, D25 min e D45min em

comparação aos momentos anteriores (-7D, -1D, 0D) e posteriores (7D, 14D) ao desmame. O tempo D5min também diferiu do D24h. O tempo 14D pós desmame, além de ser diferente dos tempos D5min, D25min e D45min também foi diferente do tempo D6h (Figura 17 G).

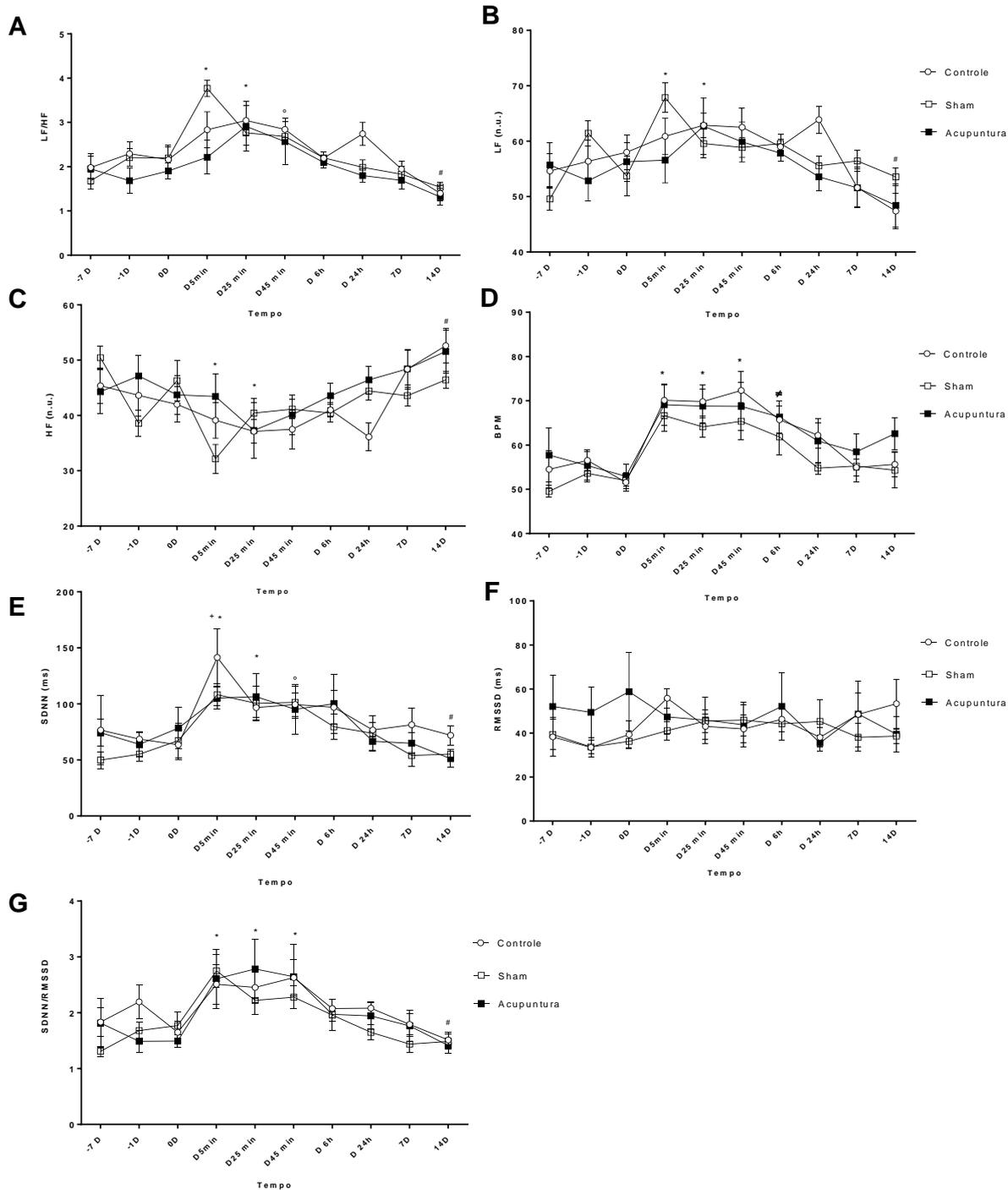


Figura 22: Análise da HRV no desmame dos potros da UFRRJ. Os tratamentos foram: grupo Controle (n= 8), grupo acupuntura falsa ou Sham (n=7) e grupo acupuntura (n=7). Os dados são apresentados como média ± EPM, nos momentos -7D, -1D, 0D, D5 min, D25min, D 45min, D 6h, D24h, 7D, 14D. (A) Razão LF/HF. (B) Componente de baixa frequência LF. (C) Componente de alta frequência HF. (D) Frequência Cardíaca Média (BPM). (E) RMSSD (raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, em um intervalo de tempo, expresso em ms). (F) SDNN (desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo, expresso em ms). (G) SDNN/RMSSD. Os símbolos (*, #, °, +) indicam diferença significativa no fator entre determinados momentos conforme descrito a seguir. (A): (*)-7D, -1D, 0D, D24h, 7D e 14D; (°)-7D, 7D, 14D; (≠) D5min, D25min, D6h, D24h. (B) e (C): (*)-7D, 7D e 14D; (≠) D5min, D25min, D45min, D6h, D24h. (D): (*)-7D, -1D, 0D, D24h, 7D e 14D; (#)-7D, -1D, 0D, 7D e 14D. (E): (*) -7D, -1D, 7D e 14D; (+): 0D, D24h; (°)-1D e 14D; (≠) D5min, D25min, D45min, D6h, D24h. (G): (*)-7D, -1D, 0D, 7D e 14D; (≠) D5min, D25min, D45min, D6h.

Teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.7.2 Comportamento

Os comportamentos foram analisados quanto à duração: tempo das ocorrências (em segundos) e quanto a frequência de ocorrências (número de vezes de cada comportamento) durante o período de 20 minutos. As ocorrências foram analisadas na primeira, quinta e vigésima terceira hora pós desmame, sendo observadas em todos os grupos de tratamento diferenças significativas apenas no fator tempo, não havendo diferença significativa nos fatores grupo e interação (Figura 23 A-E).

O repouso, não diferiu entre os três grupos: CTL, SHAM, ACUP (fator tempo $F_{(2, 46)} = 8,712$, $p = 0,0006$), havendo um menor período de repouso na primeira hora em comparação com a quinta hora ($p < 0,01$) e com a 23ª hora ($p < 0,01$) (Figura 23 A).

O comportamento de alerta ($F_{(2, 46)} = 37,05$; $p < 0,0001$) e andar ($F_{(2, 46)} = 43,67$, $p < 0,0001$), não diferiram entre os grupos (fator tempo ($p < 0,0001$), ocorrendo um maior período de alerta na primeira hora em comparação com a quinta hora ($p < 0,0001$) e com a 23ª hora ($p < 0,0001$) (Figura 23 B-C).

No comportamento de marcha e /ou cânter houve diferença significativa no fator tempo ($F_{(2, 46)} = 3,236$, $p = 0,0484$), sendo que na primeira hora houve maior quantidade do andamento em comparação com a 23ª hora ($p < 0,05$) (Figura 23 D).

O comportamento de alimentação aumentou independente do grupo (fator tempo ($F_{(2, 46)} = 12,44$, $p < 0,0001$), havendo um maior período de ingestão de alimentos na 23ª hora em comparação com a quinta hora ($p < 0,0001$) e com a primeira hora ($p < 0,05$) (Figura 23 E).

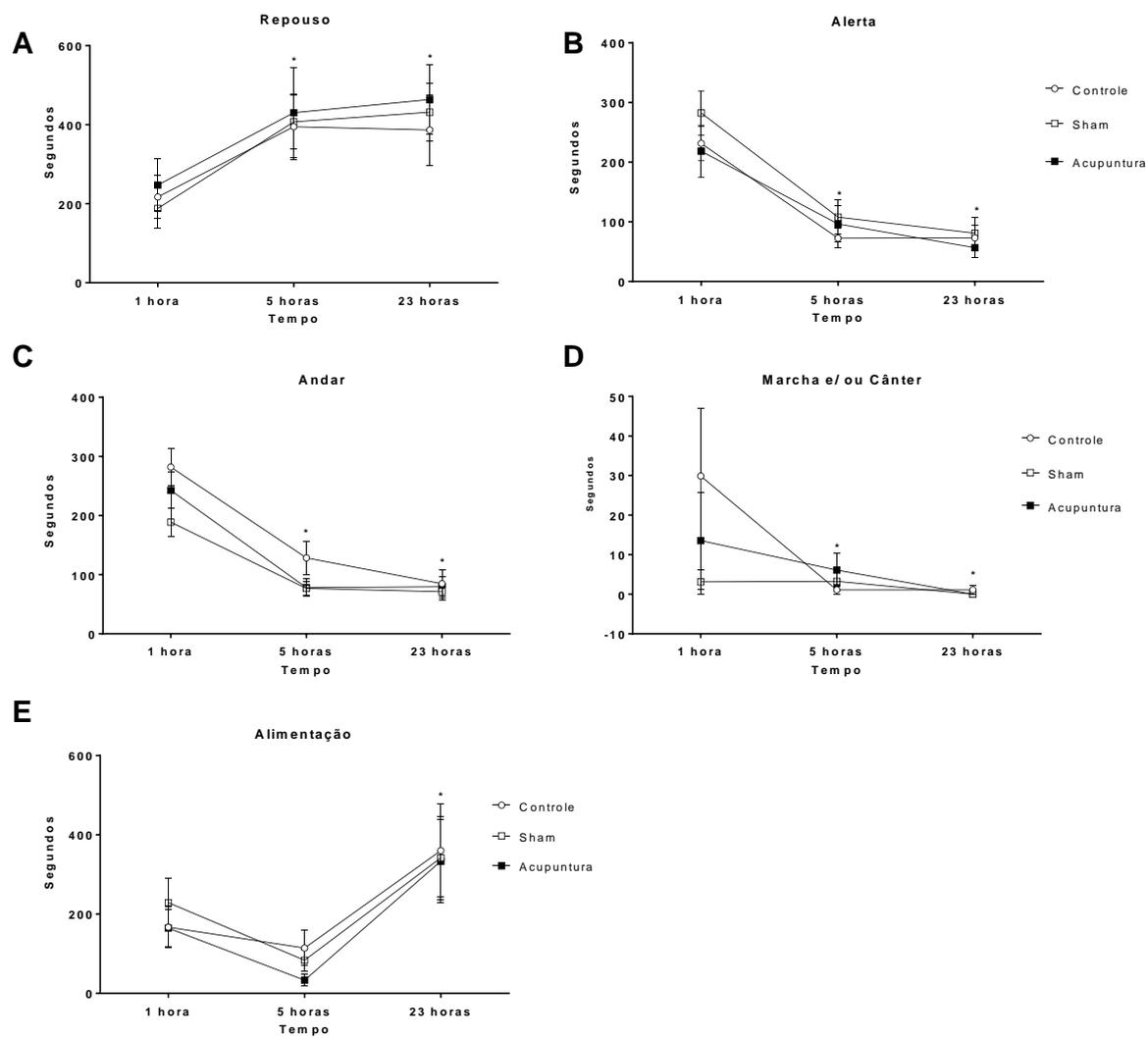


Figura 23: Análise do comportamento por tempo dos acontecimentos num intervalo de análise por 20 minutos primeira hora, quinta hora e 23ª hora após o desmame dos potros da UFRRJ. Os tratamentos foram: grupo Controle (n= 9), grupo acupuntura falsa ou Sham (n=8) e grupo acupuntura (n=9). Os dados são apresentados como média ± EPM. (A), repouso, (B) alerta, (C) andar, (D) marcha e /ou cânter, (E) alimentação. (A, B, C, D). (*) Diferença significativa no fator tempo da 1ª hora em relação a 5ª hora e a 23ª hora. (E) # diferença significativa no fator tempo da 23ª hora em relação a 1ª hora.

As ocorrências quanto a frequência de (número de vezes de cada comportamento) foram analisadas na primeira, quinta e vigésima terceira hora pós desmame, e não foram observadas diferenças significativas nos comportamentos de interação social ($p=0,7061$) (Figura 24 A) e de agressão ($p=0,8985$) (Figura 24 B), não foi observado comportamento de deitar durante as filmagens. Nos demais comportamentos avaliados foram observados diferença significativa apenas no fator tempo (Figura 24 C-H).

O comportamento de investigar, não diferiu entre os grupos: CTL, SHAM, ACUP; (fator Tempo $F(2, 46) = 25,10$, $p < 0,0001$). A investigação na primeira hora foi maior em comparação com a quinta hora ($p < 0,001$) e com a 23ª hora ($p < 0,0001$), e o investigar da quinta hora foi maior significativamente do que a 23ª hora ($p < 0,05$) (Figura 24 C).

O ato de cavar também não diferiu entre os grupos (fator tempo ($F(2, 46) = 3,483$, $p = 0,0391$). Um maior número de ocorrência do ato de cavar foi observado na primeira hora em comparação com a 23ª hora ($p < 0,05$) (Figura 24 D).

O desmame aumentou a tentativa de mamar independente do grupo (fator tempo ($F(2, 46) = 6,302$, $p = 0,0038$). Um maior número de tentativas ao mamar foi observado na 23ª hora ($p < 0,01$) em comparação com a primeira hora após desmame (Figura 24 E).

No somatório de ocorrências do ato lambar houve diferença significativa no fator tempo ($F(2, 46) = 8,417$, $p = 0,0008$). A primeira hora apresentou a maior quantidade do ato em comparação com a quinta e a 23ª hora ($p < 0,01$) (Figura 24 F).

Na análise da ocorrência de relinchar, houve diferença significativa no fator tempo ($F(2, 46) = 8,209$, $p = 0,0009$). Uma maior ocorrência de relinchar foi observada na primeira hora em comparação com a quinta hora e a 23ª hora ($p < 0,01$) (Figura 24 G).

Na análise do número de eliminação, houve diferença significativa no fator tempo ($F(2, 46) = 7,118$, $p = 0,0020$). Um maior número de eliminações foi observado na primeira hora em comparação com a quinta hora ($p < 0,05$) e a 23ª hora ($p < 0,01$) (Figura 24 H).

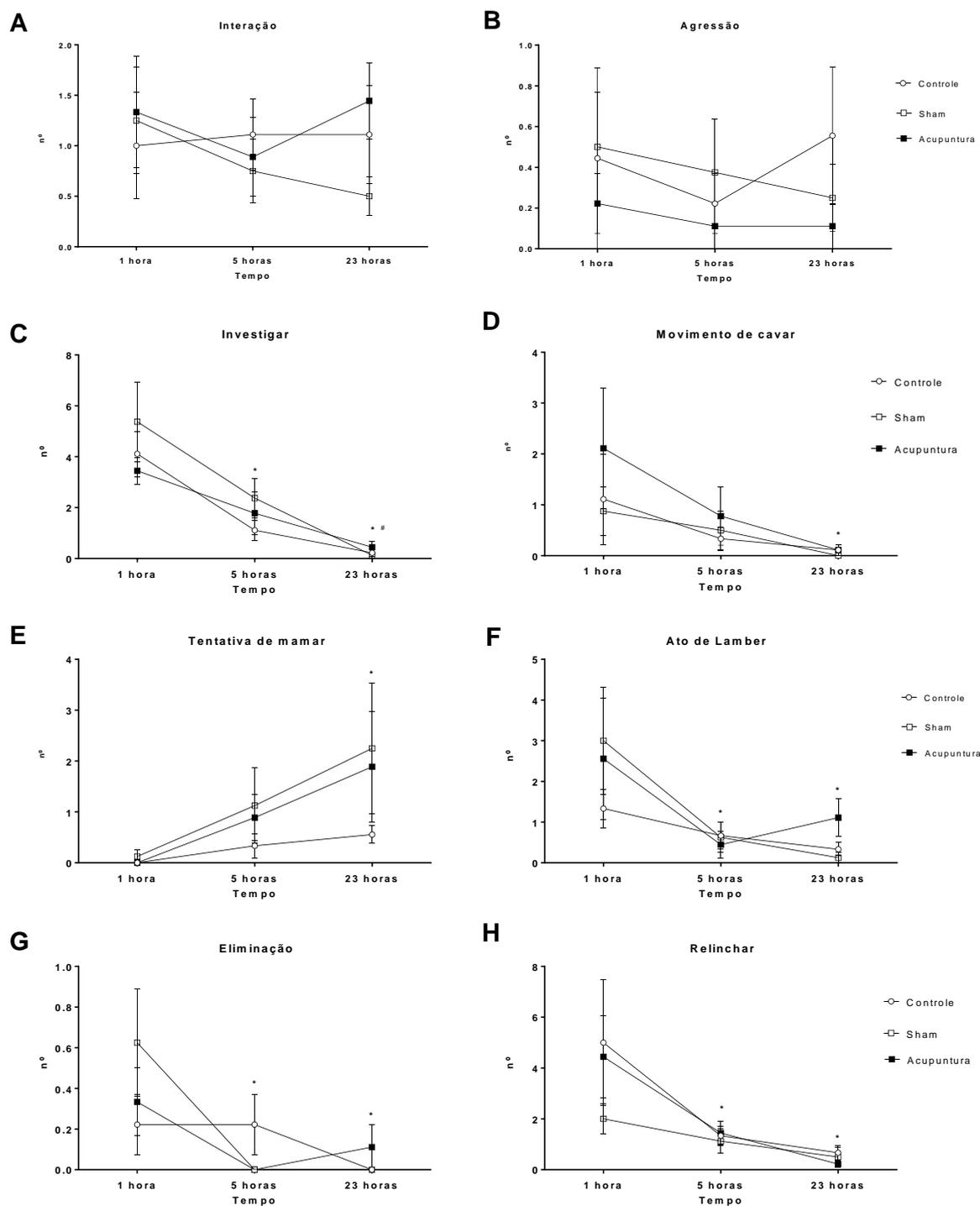


Figura 24: Análise do comportamento por número de acontecimentos num intervalo de análise por 20 minutos, na primeira hora, quinta hora e 23ª hora após o desmame dos potros da UFRRJ. Os tratamentos foram: grupo Controle (n= 9), grupo acupuntura falsa ou Sham (n=8) e grupo acupuntura (n=9). Os dados são apresentados como média \pm EPM. (A) interação social, (B) agressão, (C) investigação, (D) movimento de cavar, (E) tentativa de mamar, (F) ato de lamber, (G) eliminação, (H) relinchar. (D –E) * indica diferença significativa entre os tempos 1ª hora e 23ª horas. (F, G, H) *indica diferença significativa da 1ª hora em relação a 5ª hora e a 23ª hora. (C) todos os tempos são diferentes entre si.

4.7.3 Efeito entre os sexos (machos e fêmeas) na reatividade ao estresse.

Para avaliação do efeito entre o sexo (macho e fêmea) no comportamento dos potros pós desmame, foi observado diferença significativa apenas no comportamento de agressão no momento 1ª hora após o desmame. Os machos do grupo controle obtiveram um maior número de comportamento de agressão em comparação as fêmeas, havendo diferença significativa na interação tratamento e grupos ($p=0,0243$) conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9: Comportamento entre machos e fêmeas.

	CONTROLE		SHAM		ACUPUNTURA	
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho
REPOUSO	246,86±61,24	113±109	160,5±91,25	215,75±55,78	253,2±73,90	240±129,90
ALERTA	233,86±35,69	223,5±52,5	241±46,02	324±56,33	254,6±65,87	173±54,78
ANDAR	290,86±31,92	251,5±112,5	178,75±11,34	198,75±50,19	216,4±42,23	275,75±46,55
MARCHA / CÂNTER	33,43±21,76	17,5±17,5	6,25±6,25	0±0	2,2±2,2	27,75±27,5
ALIMENTAÇÃO	118,5±14,77	122,42±13,09	326,5±90,61	131,75±60,17	148,6±73,68	185,25±63,92
AGRESSÃO	0±0	2±2*	0,75±0,48	0,25±0,25	0,2±0,2	0,25±0,25
INTERAÇÃO	0,43±0,20	3±2	1±1	1,5±0,5	1,6±0,87	1±0,70
INVESTIGAR	3,86±0,94	5±3	5,75±1,49	5±3,03	3,8±0,97	3±0
TENTATIVA DE MAMAR	0±0	0±0	0±0	0,25±0,25	0±0	0±0
ATO DE LAMBER	1,14±0,40	2±2	2,5±2,5	3,5±1,32	3,4±2,67	1,5±0,87
MOVIMENTO DE CAVAR	1,43±1,13	0±0	0,75±0,75	1±0,71	3±2,07	1±0,70
ELIMINAÇÃO	0,28±0,18	0±0	1±0,41	0,25±0,25	0,4±0,24	0,25±0,25
RELINCHAR	5,71±3,14	2,5±2,5	1±0,58	3±0,82	5,6±2,71	3±1,47

Nota: Tabela do comportamento entre machos e fêmeas num intervalo de análise de 20 minutos, na primeira hora, após o desmame dos potros da UFRRJ. Os tratamentos foram: grupo Controle (n= 9), grupo acupuntura falsa ou Sham (n=8) e grupo acupuntura (n=9). Os dados são apresentados como média ± EPM. * Diferença significativa ($p=0,0243$).

4.8 Discussão

O desmame abrupto em potros com a presença de uma égua adulta, induziu respostas autonômicas na HRV, com aumento do tônus simpático em relação ao parassimpático, e resposta comportamentais, evidenciando-se o aumento da frequência de andar e ficar em alerta. Tais achados sugerem que houve uma elevação dos níveis de estresse no momento do desmame, não havendo diferença entre os tratamentos (Controle, Sham, Acupuntura). A acupuntura realizada no período anterior ao desmame não foi capaz de reduzir o estresse de separação potro - mãe.

Os índices de HRV estudados evidenciaram aumento da HR, LF, LF/HF, SDNN, SDNN/RMSSD e diminuição do HF nos momentos 5 e 25 minutos pós desmame, em comparação ao momento basal (-7D) e aos momentos posteriores (7D, 14D). Tais achados sugerem uma ativação simpática no momento do desmame, com elevação dos níveis de estresse neste período. Os tempos de 45 minutos e seis horas após o desmame, demonstraram ser intermediário, ocorrendo aumento em relação a alguns momentos, porém o organismo tende a buscar a normalidade dos parâmetros. Os momentos de sete e quatorze dias após o desmame, não diferem dos momentos basais (-7D e -1D) sugerindo que o organismo já esteja recuperado. O método de desmame foi eficaz para reduzir os níveis iniciais de estresse.

O processo do desmame gerou um aumento significativo da frequência cardíaca (HR) durante avaliação da primeira hora (momentos 5, 25 e 45 min pós desmame) em comparação aos momentos anteriores e aos posteriores, demonstrando que houve ativação dos mecanismos de estresse. Corroborando com os nossos achados, o aumento da HR foi descrito em diferentes tipos de desmame (MOONS; LAUGHLIN; ZANELLA, 2005; ERBER, et al. 2012a; WULF, et al. 2018).

No desmame de potros em baias individuais, Moons; Laughlin; Zanella (2005), observaram um aumento significativo da frequência cardíaca (HR), em resposta ao estresse, no dia do desmame ($P < 0,01$). Eles observaram uma HR média de $86,57 \pm 1,05$ batimentos cardíacos por minuto (BPM), imediatamente após o desmame. Este método proporcionou uma maior HR em comparação ao presente estudo, no qual obteve HR média de $70,11 \pm 3,52$ bpm (grupo controle), $66,6 \pm 3,42$ bpm (grupo sham) e $69,09 \pm 4,74$ bpm (grupo acupuntura), na análise dos primeiros cinco minutos pós desmame. Sugerindo que o desmame em baias apresente maiores níveis de estresse em comparação ao desmame em piquetes.

No desmame de potros em grupos, alojados em piquetes, Erber et al. (2012a) avaliaram três métodos de desmame. Grupo 1: desmame abrupto sem a presença de uma égua adulta. Grupo 2: desmame abrupto, com a presença de duas éguas adultas, porém sem parentesco. Grupo 3: desmame consecutivo, retirando duas éguas por dia, durante três dias. Eles observaram um aumento da HR no grupo 1, em comparação aos demais grupos, no momento do desmame. Sendo por eles atribuído a maior HR, a maior quantidade de andar neste grupo de animais.

O desmame de potros em grupo, sem a presença de uma égua adulta, também foi avaliado por Wulf et al. (2018), que observaram um aumento na HR, com pico imediatamente após a remoção das éguas, continuando elevada dentro de quatro horas após o desmame.

Na análise da HRV, no domínio do tempo, Erber et al. (2012a), obtiveram uma diferença significativa no SDRR (SDNN), independentemente do grupo, estando o índice elevado no dia 1^a em comparação ao 8^a dia após o desmame. Nos nossos achados o SDNN, apresentou aumento nos primeiros momentos pós desmame (5min e 25min), sendo significativa a redução a partir do sétimo dia após o desmame. Quanto a análise do RMSSD, Erber et al. (2012a), observaram diferença significativa no tempo e entre os grupos. No sexto dia foi observado maiores valores de RMSSD no grupo 2 (desmame com égua adulta), em comparação ao oitavo. Entretanto Wulf et al. (2018) ao avaliar em o RMSSD, não encontraram diferença significativa em nenhum fator estudado, tal achado corrobora com os presentes resultados da pesquisa.

O aumento do SDNN é esperado em situações de estresse, porém não pode se distinguir se o aumento é devido ao aumento da modulação simpática ou a retirada vagal (VON BORELL et al., 2007). Enquanto que o valor do RMSSD aumenta conforme o incremento da ativação parassimpática (VON BORELL et al., 2007). No presente estudo não houve diferença significativa no RMSSD, sugere-se portanto que o aumento do SDNN tenha sido por ativação simpática, ocasionado pelo estresse do desmame, independente dos tratamentos.

A razão SDNN/RMSSD, demonstrou um aumento significativo nos primeiros 5 minutos após o desmame tal resultado também foi obtido na análise da razão LF/HF. O SDNN/RMSSD, neste experimento foi uma ferramenta eficaz na análise da HRV de curta duração, conforme sugerido por Sollers et al. (2007).

Quanto aos parâmetros de HRV no domínio da frequência, não foram encontradas as análises em desmame de potros. O presente estudo apresentou aumento dos índices LF, HF e LF/HF em função do desmame, sendo independente dos grupos de tratamentos.

A acupuntura realizada no período pré-desmame não foi capaz de alterar nenhum parâmetro da HRV. Porém Anderson et al. (2012), observaram uma redução na razão LF/HF em humanos saudáveis após acupuntura. Em animais, a acupuntura realizada 20 minutos antes da audição do som de trovão, proporcionou em cães da raça Beagle, uma redução da razão LF/HF, em comparação a animais não tratados e submetidos ao mesmo som (MACCARIELLO, et al. 2018). Em equinos, a acupuntura realizada 20 minutos antes do sobressalto e também anterior às corridas, apresentou uma redução da razão LF/HF, em comparação a animais não tratados. Nestes estudos, a acupuntura, realizada anteriormente, proporcionou um maior efeito tranquilizante, devido à predominância parassimpática evidenciada pelos autores. No presente experimento, a acupuntura foi realizada em quatro dias alternados, e a quarta sessão foi realizada no dia anterior ao desmame, talvez por esse motivo não foi observado o efeito tranquilizante da acupuntura. Quiçá o desmame seja um estímulo primitivo, as respostas à separação materna, provavelmente, estejam ligadas a fenômenos primários, instintivos e que poucos estímulos externos possam modificar as respostas geradas pela separação materna.

É necessário que as respostas fisiológicas sejam relacionadas ao comportamento do animal, a fim de evidenciar que o evento foi estressante.

No presente estudo foram avaliados apenas os comportamentos após o desmame, não sendo aferido o comportamento basal na presença das mães. Os tempos pós desmame foram avaliados entre si, e não houve diferença entre os tratamentos (Controle, Sham, Acupuntura). A acupuntura não alterou os comportamentos pós desmame.

Na primeira hora, houve um aumento do comportamento de andar, permanecer em alerta, investigar, lambear, relinchar, eliminar e diminuição da frequência de repouso em comparação com a quinta e a 23ª hora após o desmame. As frequências dos comportamentos de cavar e o andamento de Marcha/cânter foram maiores na primeira hora em relação à 23ª hora, sendo os valores da 5ª hora intermediários. Após 23 horas, observou-se um aumento da frequência de alimentação em comparação com a quinta e a primeira hora após o desmame. O aumento nas tentativas de mamar foi evidenciado na 23ª hora em comparação à primeira hora. Na 23ª hora o potro está mais tranquilo, com maiores tempos de repouso, e pastejo, porém ele sente a falta do leite, como um alimento que faz parte da dieta, mesmo não sendo essencial para o seu desenvolvimento, fato evidenciado pelo aumento da tentativa de mamar.

Não foram obtidas diferenças significativas no comportamento de agressão e de interação social no presente estudo. Entretanto Waters et al. (2002) observaram potros brigando e relacionaram como um fato dos animais estarem formando um novo grupo. Neste estudo, a hierarquia pode ser atribuída à égua adulta, sendo uma possível explicação para a diminuição deste comportamento. Nicol et al. (2005a) observaram que o comportamento antissocial aumenta com a idade, já Hoffman et al. (1995) dizem que é comum este comportamento em potros desmamados em dupla por causa do estresse emocional sofrido por estes.

Pelo fato dos animais se encontrarem em piquetes a interação social não foi tão evidente como em animais desmamados em baias. Garcia et al. (2010) observaram que os animais recém estabelecidos buscavam contato com o animal vizinho de baias. Nicol et al. (2005b) observaram potros de éguas submissas praticando e recebendo o comportamento de interação social, com maior frequência em relação aos potros de éguas dominantes. Nicol et al. (2005a) observaram que este comportamento também diminui com a idade.

No presente estudo, não houve a presença do comportamento de deitar, em nenhum dos momentos avaliados, sendo observada baixa incidência no decorrer do desmame. Spindola (2013) também não obteve diferença significativa neste comportamento. Nicol et al. (2005a) observaram que estes comportamentos são mais frequentes e com duração maior na faixa de dois meses, sendo que na fase de desmame, a partir de seis meses, estes comportamentos tornam-se menos frequentes, corroborando com nossos achados. Moons; Laughlin; Zanella, (2005), em seu estudo, observaram que os animais deitaram mais no período anterior ao desmame, sendo esse comportamento reduzido após o desmame.

Na primeira hora do desmame, foi evidenciado o aumento da locomoção (andar, marcha e /ou cânter) dos potros, estando de acordo com outros achados (HOUP; HINTZ 1983; MCCALL et al. 1987; HOFFMAN et al. 1995; ERBER et al., 2012a; SPINDOLA, 2013). Segundo McCall et al. 1985, os potros passaram a maior parte do tempo caminhando e se movendo apenas um pouco no modo de marcha e /ou cânter ou galope, estando de acordo com nossos resultados.

Após 23 horas do desmame, observou-se uma diminuição da locomoção, porém Spindola (2013), utilizando o mesmo método de desmame do presente estudo com potros mangalarga marchador, observou uma maior na frequência da locomoção um dia após o desmame. Entretanto, em seu estudo, a locomoção não foi avaliada no momento imediatamente após o desmame, e também não foi relatado o comportamento basal dos potros, anteriormente ao desmame.

O estudo de Moons; Laughlin; Zanella (2005) no desmame individual de animais em baias, observaram que os animais do grupo Controle (que não tiveram separação prévia da mãe), apresentaram maior tempo de locomoção, no dia pós desmame, em comparação aos momentos basais. Nicol et al. (2005a), obtiveram dados de duração e frequência, próximos aos encontrados para animais estabelecidos e também observaram que o tempo gasto com este comportamento foi diminuindo com tempo pós desmame. Segundo McGee e Smith (2004) potros desmamados em grupos apresentam uma frequência menor deste comportamento do que animais desmamados isoladamente. Erber et al. (2012a) observaram aumento da locomoção no dia do desmame nos grupos A (desmame abrupto sem a presença da égua adulta) e C (com retirada gradual das mães), sendo obtidos menores valores no grupo B (desmame abrupto com a presença de uma égua adulta).

No presente estudo, o comportamento de alerta foi, altamente, significativo, sendo mais elevado na primeira hora em comparação com as demais. Spindola (2013), apesar de suas limitações observou um aumento do alerta no primeiro dia pós desmame, com diminuição do comportamento após sete dias de desmame. Nicol et al. (2005a) relataram que animais alimentados com dieta rica em fibra passaram mais tempo ficando em alerta do que os animais que foram alimentados com dieta rica em amido, em animais desmamados em baias. No presente experimento, o maior valor do comportamento de alerta foi evidenciado na primeira hora, antes da ingestão de qualquer alimento, sendo sugerido que este aumento seja devido a insegurança do potro de estar em um local novo, sem a presença da mãe.

Na primeira hora do desmame, foi evidenciado o aumento do ato de investigar, em comparação ao demais momentos pós desmame. Spindola (2013), apesar de suas limitações, observou um aumento do ato de investigar no primeiro dia pós desmame, com diminuição do comportamento após sete dias de desmame Guirro et al. (2009) afirmam que um animal mais

velho inspira confiança aos potros. Porém Nicol et al. (2005a), avaliando o desmame em animais estabulados, observaram também que a duração deste comportamento fora diminuindo no período pós desmame.

O local onde os potros foram desmamados não era de conhecimento prévio dos animais, sendo conferido ao potro uma reação de novidade, além da ausência da mãe. Porém, é muito comum na prática do desmame, o local ser diferente. Tal fato tenta elucidar o aumento da frequência de investigar, e ficar em alerta na primeira hora do desmame, em comparação as demais.

O desmame abrupto em grupos em um local de conhecimento prévio dos potros foi avaliado por Dubcová et al. (2015) e foi comparado com o desmame em um local desconhecido. O desmame em local desconhecido proporcionou um aumento dos níveis de cortisol, sugerindo ser um estímulo que acarrete maiores níveis de estresse, associando o estresse da novidade ao estresse da separação do potro da égua. Porém, não foram avaliados os parâmetros comportamentais deste estudo.

No presente estudo, foi estudado a eliminação, que engloba a defecação e urina, estando estes elevados na primeira hora pós desmame, não havendo diferença entre os sexos. Tais achados estão de acordo com trabalhos de desmame em piquetes, sendo encontrado também um aumento deste comportamento no período pós desmame (Erber et al, 2012a; Wulf et al.,2018). Erber et al. (2012a) além do aumento da defecação no período do desmame, observou um aumento o grupo C (desmame com retirada consecutiva de éguas), no primeiro dia após o desmame. E Wulf et al. (2018) observaram que machos defecam mais que as fêmeas, nos períodos iniciais do desmame.

Nicol et al. (2005a) observaram que potros desmamados em estábulo defecam mais e apresentam o comportamento de andar e investigar com maior frequência, gastando menos tempo para comer, que potros desmamados em piquetes. Eles consideraram que o desmame em estábulo é mais estressante que em piquetes. Moons; Laughlin; Zanella (2005) estudando animais estabulados em animais estabulados, também observaram o aumento da defecação durante o desmame, em comparação aos momentos anteriores e posteriores.

Após 23 horas do desmame, os comportamentos apresentados no primeiro dia diminuíram significativamente, e observou-se uma maior tentativa de mamar, os potros apresentaram um maior tempo em repouso, geralmente, próximo da égua madrinha, e aumentaram o tempo da alimentação, demonstrando estarem adaptados ao novo ambiente, sentindo-se seguros abaixar a cabeça e se alimentarem.

Erber et al. (2012a) sugerem que o maior tempo de repouso, foi evidenciado no “grupo B” (desmame abrupto com a presença de duas éguas madrinhas), nos dias subseqüentes ao desmame, sendo sugerido que tal comportamento pode ser induzido pela égua adulta. Para Spindola (2013), o comportamento de ficar em descanso diminuiu com desmame, sendo observado uma frequência elevada apenas primeiro dia pós desmame, sendo sugerido a relação com a apatia gerada pelo estresse. Concordando com estes dados, Nicol et al. (2005a) observaram que a frequência deste comportamento diminui com a idade, é normal aumentar até os quatro meses e depois diminuir.

A maior tentativa de mamar foi evidenciada na 23ª hora. Não houve diferença entre os outros momentos. Nicol et al. (2005a) observaram que potros com quatro meses que receberam dieta rica em fibra mamarão com uma frequência maior do que os alimentados com dieta rica em amido. Também observaram que a frequência deste comportamento diminuiu com a idade, Como a maior frequência foi no dia pós desmame, este fato pode estar relacionado com a falta da mãe.

A duração do comportamento de pastear foi aumentando conforme os dias após o desmame, fato também encontrado por Spindola et al. 2013. Nicol et al. (2005a), por outro lado, estes observaram que quando a dieta é rica em fibra e óleos, há uma tendência dos potros em

comer mais pasto quando comparados com animais que comiam dieta rica em amido. Hoffman et al. (1995), observaram que potros desmamados em pares, apresentaram uma frequência maior deste comportamento quando comparados com animais desmamados sozinhos. Também observaram que potros passaram mais tempo se alimentando do que potras e animais que receberam dieta com apenas pasto e feno passaram menos tempo pastando que animais que receberam pasto, feno e concentrado. Dittrich et al. (2010) observaram que animais alimentados exclusivamente com pasto destinaram maior tempo diário à alimentação quando comparados com animais que se alimentavam de dietas com concentrado (50% e 100% das necessidades nutricionais). Garcia et al. (2010) observaram que a maior frequência em seu estudo foi do comportamento alimentação sem diferença entre o sexo.

Hoffman et al. (1995) compararam o tempo pós desmame e observaram que com o passar dos dias o tempo gasto com a alimentação foi aumentando, corroborando com os resultados do presente estudo. O presente estudo concorda com os dados de McGreevy (2004), que após a adaptação do desmame, os animais apresentaram uma maior frequência de alimentação.

No desmame de piquetes fica também evidenciada a redução da alimentação no dia do desmame (ERBER et al., 2012; WULF, et al. 2018), não havendo diferença significativa entre os sexos (WULF, et al. 2018) corroborando com os nossos achados.

Em vida livre, o cavalo prioriza a segurança, seguida por conforto e interações sociais com os demais membros do grupo e, por fim, a alimentação, que é vista como uma consequência de um local seguro onde o grupo optou por permanecer. Em um primeiro momento, isto pode parecer estranho, mas fica evidente ao analisar que o cavalo só poderá se alimentar se permanecer vivo, ou seja, se estiver seguro de predadores (BIRD, 2004; CINTRA, 2011).

Naturalmente, os cavalos fazem parte de um grupo. Em sua evolução, a comunicação foi desenvolvida para expressão do indivíduo que precisa de outros integrantes do grupo para viver bem e sobreviver aos desafios do ambiente. Os cavalos se comunicam muito bem por meio da linguagem corporal, e assim, também recebem as informações de outros indivíduos da sua convivência (como predadores e seres humanos). Cavalos mostram-se grandes, ativos e alertas, por meio de uma postura avançada, pescoço e cabeça erguidos, movimentos das orelhas e dos lábios como forma de reação a diferentes estímulos do ambiente, podendo também realizar a vocalização para se comunicarem (BIRD, 2004; CINTRA, 2011).

O comportamento de vocalização estava elevado na primeira hora após o desmame, tais achados também foram evidenciados no desmame em piquetes (ERBER et al., 2012a; WULF, et al. 2018) e em baias (MOONS; LAUGHLIN; ZANELLA, 2005). Entretanto, Hoffman et al. (1995) notaram que animais desmamados em pares gastam menos tempo com este comportamento que os desmamados sozinhos. Quando estes potros recebem uma dieta só com pasto e feno tendem a gastar mais tempo vocalizando que os animais que recebem feno, pasto e concentrado. Comparando com o tempo pós desmame, observaram que com o passar dos dias o tempo gasto com vocalização foi diminuindo. Concordando com este estudo, Nicol et al. (2005b) também observaram que os potros de seu estudo gastaram pouco tempo vocalizando. Outro fato é que, com a idade, este comportamento diminui (NICOL et al. 2005a). McGee e Smith (2004) observaram que potros desmamados isolados vocalizam com maior frequência do que potros desmamados acompanhados.

A vocalização foi sugerida como um parâmetro adequado para determinação da ansiedade em potros (HOUPTE; HINTZ, 1984; MCCALL et al., 1985; HOFFMANN et al., 1995; APTER; HOUSEHOLDER, 1996). No presente estudo, a vocalização foi designada como relinchar, pois os animais emitiam som com intenção de chamar a mãe e não como sinal de dor, conforme demonstrada no Capítulo I. O comportamento de relinchar era mais evidente na primeira hora da separação das mães, em comparação com os demais momentos posteriores ao desmame. Tal fato sugere que os potros estavam tentando se comunicar com as mães. Segundo Lemasson et

al., (2009) um relincho mais frequente após o desmame, provavelmente, reflete as tentativas dos potros de ficar em contato com suas mães. Sinais vocais são usados para manter contato a longa distância, após a separação entre os cavalos (LEMASSON et al., 2009).

No presente estudo, chamou atenção o ato de lambar, observado em alguns animais que permanecerem lambendo o cocho sem haver alimento nele. O ato de lambar foi diminuído após 23 horas do desmame. Neste caso, não foi considerado como uma estereotipia oral. O aumento talvez esteja relacionado à curiosidade do potro diante a um objeto novo que, provavelmente, continha odor de alimento, por ser um cocho usado para colocar o concentrado. As estereotípicas orais estão, comumente, relacionadas com a dieta e restrição do comportamento de pastejo. Em estudo realizado por Waters et al. (2002) foi demonstrado que o desmame e o comportamento da mãe têm influência no desenvolvimento de aerofagia, principalmente, quando o desmame é realizado em baia ou em estábulo. Potros de éguas dominantes têm uma incidência maior de problemas comportamentais, quando comparados com potros de éguas com comportamento mais submisso e 74% dos potros que desenvolveram aerofagia, antes apresentaram o hábito de roer madeira.

O ato de cavar estava aumentado na primeira hora em comparação às demais, tal achado também foi descrito em cavalos estabulados (MOONS; LAUGHLIN; ZANELLA, 2005), com a redução acentuada deste ato, não sendo evidenciada como uma estereotipia locomotora.

Sugere-se que o processo de desmame com uma égua familiar seja eficaz para redução do estresse no período de desmame, corroborando com os achados de Erber et al. (2012a) que concluíram que potros desmamados simultaneamente em grupos, com a presença de duas éguas que já conheciam desde o nascimento apresentavam uma menor resposta de estresse ao desmame, em comparação com potros desmamados em grupos sem a presença de égua ou com a remoção gradual de duas éguas por dia, até permanecerem sozinhos.

HENRY et al. (2012) chegaram à mesma conclusão sobre a presença de éguas adultas no período pós desmame, sendo a presença das éguas um fator atenuante do estresse. Em seus estudos, o grupo de potros desmamados sem a presença de cavalos adultos apresentaram elevados parâmetros de estresse, com aumento do cortisol salivar, do relinchar, e da agressividade e a presença de comportamentos anormais.

Em suma, é de extrema importância a busca contínua de novas formas de minimização do estresse. O conhecimento sobre a fisiologia e o comportamento dos potros desmamados, descritos neste trabalho, são ferramentas importantes para o desenvolvimento de novas estratégias de manejo, que proporcionarão uma grande melhoria no bem-estar animal.

4.9 Conclusões

- O desmame, abrupto em potros com a presença de uma égua adulta, induziu respostas autonômicas na HRV, e resposta comportamentais, indicativas de estresse nos três tratamentos (Controle, Sham, Acupuntura).
- Os índices de HRV estudados evidenciaram aumento da HR, LF, LF/HF, SDNN, SDNN/RMSSD e diminuição do HF nos primeiros momentos do desmame, sugerindo uma ativação simpática, com elevação dos níveis de estresse.
- Na análise comportamental foi evidenciado um aumento nos comportamentos indicativos de estresse, como permanecer em alerta, andar, investigar, lambear, relinchar, eliminar e uma diminuição da frequência de repouso e do pastejo, durante a primeira hora do desmame em relação aos demais momentos.
- O tratamento com quatro sessões de acupuntura, com intervalo de um dia (nos pontos: VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1), realizada no período anterior ao desmame não foi capaz de reduzir o estresse do mesmo em nenhum dos parâmetros avaliados.
- As principais alterações fisiológicas e comportamentais ocorreram entre o momento inicial do desmame e a 24^a hora após o mesmo, devendo ser considerado este o período que demanda uma maior atenção ao potro desmamado, a fim de reduzir os riscos de doenças e acidentes.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- A marcação, tanto a fogo como a nitrogênio, e o desmame foram capazes de promover alterações indicativas de estresse, estas representadas por alterações nos parâmetros fisiológicos e comportamentais dos potros.
- A marcação com nitrogênio promoveu menores níveis de estresse durante o ato de marcar, quando comparada a marcação a fogo, porém não as duas não diferiram quanto a nitidez final ao 7º mês, entretanto a marcação a nitrogênio foi melhor no aspecto de não proporcionar feridas abertas.
- No desmame as principais alterações fisiológicas e comportamentais ocorreram entre o momento inicial da separação mãe-potro e a 24ª hora após, devendo ser considerado este o período que demanda uma maior atenção ao potro desmamado, a fim de reduzir os riscos de doenças e acidentes.
- A acupuntura realizada no período anterior ao desmame não foi capaz de reduzir o estresse da separação, entre o potro e a égua, em nenhum dos parâmetros avaliados. Sugere-se novos estudos com a aplicação da acupuntura no período pós-desmame.
- O conhecimento sobre os parâmetros fisiológicos e comportamentais dos potros submetidos aos manejos de marcação e desmame, que constituem uma das práticas agropecuárias, é de suma importância para manutenção do bem-estar animal. Porém a maior relevância está na divulgação desses resultados aos produtores, a fim de proporcionar melhores índices de qualidade de vida em seus animais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, U. Rajendra et al. Heart rate variability: a review. **Medical & Biological Engineering & Computing**, [s.l.], v. 44, n. 12, p.1031-1051, 17 nov. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11517-006-0119-0>.

AKANA, S F et al. Feedback and facilitation in the adrenocortical system: unmasking facilitation by partial inhibition of the glucocorticoid response to prior stress.. **Endocrinology**, [s.l.], v. 131, n. 1, p.57-68, jul. 1992. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/endo.131.1.1319329>.

ANTONELLI, Michele; DONELLI, Davide. Effects of balneotherapy and spa therapy on levels of cortisol as a stress biomarker: a systematic review. **International Journal Of Biometeorology**, [s.l.], v. 62, n. 6, p.913-924, 18 fev. 2018. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00484-018-1504-8>.

APTER, R.C.; HOUSEHOLDER, D.D.. Weaning and weaning management of foals: A review and some recommendations. **Journal Of Equine Veterinary Science**, [s.l.], v. 16, n. 10, p.428-435, out. 1996. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0737-0806\(96\)80208-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0737-0806(96)80208-5).

ASCHBACHER, Kirstin et al. Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity. **Psychoneuroendocrinology**, [s.l.], v. 38, n. 9, p.1698-1708, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.02.004>.

AUBERT, André E.; SEPS, Bert; BECKERS, Frank. Heart Rate Variability in Athletes. **Sports Medicine**, [s.l.], v. 33, n. 12, p.889-919, 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.2165/00007256-200333120-00003>.

AURICH, J.E. et al. Readability of branding symbols in horses and histomorphological alterations at the branding site. **The Veterinary Journal**, [s.l.], v. 195, n. 3, p.344-349, mar. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.07.006>.

BAI, L.; LAO L. Neurobiological Foundations of Acupuncture: The Relevance and Future Prospect Based on Neuroimaging Evidence. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, CAM** 2013:812568, 2013.

BARLAS, Panos et al. Lack of effect of acupuncture upon signs and symptoms of delayed onset muscle soreness. **Clinical Physiology**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.449-456, 14 nov. 2000. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2281.2000.00280.x>.

BARTOŠOVÁ, Jitka et al. Concurrent Lactation and Pregnancy: Pregnant Domestic Horse Mares Do Not Increase Mother-Offspring Conflict during Intensive Lactation. **Plos One**, [s.l.], v. 6, n. 8, p.22068-22068, 10 ago. 2011. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022068>.

BASELLI, G. et al. Heart rate variability signal processing: A quantitative approach as an aid to diagnosis in cardiovascular pathologies. **International Journal Of Bio-medical Computing**, [s.l.], v. 20, n. 1-2, p.51-70, jan. 1987. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-7101\(87\)90014-6](http://dx.doi.org/10.1016/0020-7101(87)90014-6).

BERGER, Jeannine M. et al. Behavioral and physiological responses of weaned foals treated with equine appeasing pheromone: A double-blinded, placebo-controlled, randomized trial. **Journal Of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.265-277, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jveb.2012.09.003>.

BERK, Lee S. et al. Neuroendocrine and Stress Hormone Changes During Mirthful Laughter. **The American Journal Of The Medical Sciences**, [s.l.], v. 298, n. 6, p.390-396, dez. 1989. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1097/00000441-198912000-00006>.

BIRD, J. CUIDADO NATURAL DEL CABALLO: **Um enfoque natural para su óptimo estado de salud, desarrollo y rendimiento**. Barcelona, ed. Acanto. p.206, 2004.

BOWEN, I. M.; MARR, C. M. Analysis of heart rate variability in horses with ventricular arrhythmias. **Proceedings of the 37th British Equine Veterinary Association Congress**,

Birmingham. 1998

BRASIL. Assembleia Legislativa. Lei nº 11794, de 08 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências.. **Lei Arouca**. Brasília, RIO DE JANEIRO: Diário Oficial da União, 09 out. 2008. Seção 1, p. 1-1.

BRASIL. Ministério de agricultura pecuária e abastecimento. Instrução normativa SDA nº 10, de 3/03/2017. **Diário Oficial da União**. Aprova o Regulamento Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose Animal.2017

BRASIL. Ministério de agricultura pecuária e abastecimento. Instrução normativa nº45 de 15 de junho de 2004. **Diário oficial da união** de 07/07/2004, seção 1, página 7. Aprova as normas para a Prevenção e o Controle da Anemia Infecciosa Equina - A.I.E.2004

BROOM, D.m.. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, [s.l.], v. 142, n. 6, p.524-526, nov. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0007-1935\(86\)90109-0](http://dx.doi.org/10.1016/0007-1935(86)90109-0).

BROOM, D.m.; MOLENTO, C.f.m.. BEM-ESTAR ANIMAL: CONCEITO E QUESTÕES RELACIONADAS – REVISÃO. **Archives Of Veterinary Science**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.1-11, 31 dez. 2004. Universidade Federal do Parana. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v9i2.4057>.

CABRERA, L.; FERNANDES, L.C.; MORAES, C.M.M. Composição de leite de éguas PSI e desenvolvimento ponderal de suas crias. **A Hora Veterinária**, v.10, n.55, 1990.

CAI, Mudan et al. The Effects of Bee Venom Acupuncture on the Central Nervous System and Muscle in an Animal hSOD1G93A Mutant. **Toxins**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.846-858, 13 mar. 2015. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins7030846>.

CAIN, M. J. **Acupuncture diagnosis and treatment of the equine: a five element tutorial**. Kentucky: M.J.Cain Books, 2003.

CAJA, G. et al. Diversity of animal identification techniques: from “fire age” to “electronic age”. **ICAR Technical Series**, n. 9, p. 21–41, 2004.

CAMERON, E. Z. et al. Aging and improving reproductive success in horses: declining residual reproductive value or just older and wiser?. **Behavioral Ecology And Sociobiology**, [s.l.], v. 47, n. 4, p.243-249, 23 mar. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s002650050661>.

CANNON, W. B. **Bodily changes in pain, hunger, fear and rage; an account of recent researches into the function of emotional excitement** D. Appleton and Co., New York, London, 1929.

CANNON, W.B. **Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage: an Account of Recent Researches in the Function of Emotional Excitement** (Boston, USA). 1953.

CERUTTI, S., BIANCHI, A.M., MAINARDI, L.T.,. In: Malik, M., Camm, A.J., Armonk, N.Y. (Eds.), **Spectral Analysis of the Heart Rate Variability Signal**. Futura, pp. 63–7.1995

CHIDA, Yoichi; STEPTOE, Andrew. Cortisol awakening response and psychosocial factors: A systematic review and meta-analysis. **Biological Psychology**, [s.l.], v. 80, n. 3, p.265-278, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsycho.2008.10.004>.

CHRISTENSEN, J. W. et al. Effects of hyperflexion on acute stress responses in ridden dressage horses. **Physiology & Behavior**, v. 128, p. 39–45, 2014.

CINTRA, A. G. DE C. **O CAVALO: Características, Manejo e Alimentação**. 1º Edição ed. Roca, 2011

COLEMAN, R. J.; MATHISON, G. W.; BURWASH, L. Growth and condition at weaning of extensively managed creep-fed foals. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 19, n. 1, p. 45–50, 1999.

CUNHA, T.J. **Horse feeding and nutrition**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1991.

445p.

DE KLOET, E. R., VREUGDENHIL, E., OITZL, M. S.; JOELS, M. BRAIN corticosteroid receptor balance in health and disease. **Endocr. Rev.** **19**, 269–301.1998.

DEMPSEY, Peter J.; COOPER, Theodore. VENTRICULAR CHOLINERGIC RECEPTOR SYSTEMS: INTERACTION WITH ADRENERGIC SYSTEMS. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [S. I.], v. 2, n. 167, p.282-290, jun. 1969.

DITTRICH, J.R.; NETO, A.S.; SWAROSKI, D.; et al. Comportamento alimentar de potros da raça Mangalarga Marchador submetidos a ofertas de alimento e confinamento noturno. **Archives of Veterinary Science**, v. 15, n. 4, p. 211-217, 2010.

DOBROMYLSKYJ, P., P. A. FLECKNELL, B. D. LASCELLES, H. LIVINGSTON, P. TAYLOR, AND A. WATERMAN-PEARSON. **Pain assessment**. In: Flecknell, P.A. (eds), Pain Manag An, p. 53–79. W.B. Saunders, London, UK. 2000.

DOREAU, M.; BOULOT, S.; BAUCHART, D. et al. Yield and composition of milk from lactating mares: effect of lactation stage and individual differences. **Journal of Dairy Research**, v.57, p.449-454, 1990.

DOREAU, M.; BOULOT, S.; BAUCHART, D. et al. Voluntary intake, milk production and plasma metabolites in nursing mares fed two different diets. **Journal of Nutrition**, v.122, p.992-999, 1991.

DRAEHMPAEHL, D.; ZOHMANN, A. **Acupuntura no cão e no gato – Princípios básicos e prática científica**. São Paulo: Roca, p.245. 1997.

DUBCOVÁ, J.; BARTOŠOVÁ, J.; KOMÁRKOVÁ, M. Effects of prompt versus stepwise relocation to a novel environment on foals' responses to weaning in domestic horses (*Equus caballus*). **Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**, v. 10, n. 4, p. 346–352, 1 jul. 2015.

DUNCAN, I.J.H.; PETHERICK, J.C. The implication of cognitive processes for animal welfare. *Journal of Animal Science*, Savoy, v. 69, p. 5017-5022, 1991.

DUNCAN, P.; HARVEY, P. H.; WELLS, S. M. On lactation and associated behaviour in a natural herd of horses. **Animal Behaviour**, v. 32, n. 1, p. 255–263, 1984.

ERBER, R. et al. Behavioral and physiological responses of young horses to different weaning protocols: A pilot study. **Stress**, v. 15, n. 2, p. 184–194, 2012a.

ERBER, R. et al. Physiological and behavioural responses of young horses to hot iron branding and microchip implantation. **Veterinary Journal**, v. 191, n. 2, p. 171–175, 2012b.

ESHKEVARI, L.; ESHKEVARI, E.; PERMAUL, L. AND MULRONEY, S. E. Acupuncture blocks cold stress-induced increases in the hypothalamuspituitary- adrenal axis in the rat. **Journal of Endocrinology**, vol. 217, no. 1, p. 95–104, 2013.

EVANS, J. W., BORTON, A., HINTZ, H. F.; VAN VLECK, L. D. **The Horse**. San Francisco: W. H. Freeman. 1977.

FAUBLADIER, C.; JULLIAND, V.; DANIEL, J.; PHILIPPEAU, C. Bacterial carbohydrate-degradation capacity in foal feces: changes from birth to pre- weaning and effect of the maternal supplementation with fermented feed products. *The British Journal of Nutrition*. v. 110, p. 1040-1052, 2013.

FOLKMAN, S. Stress: appraisal and coping. In: **Encyclopedia of behavioral medicine**. Springer, New York, pp 1913–1915. 2013. [https:// doi.org/10.1007/978-1-4419-1005-9_215](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1005-9_215)

FRANCI, C. R. Estresse: Processos adaptativos e não adaptativos. In: ANTUNES RODRIGUES, J. **Neuroendocrinologia Básica Aplicada**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.15, p.200-223. 2005

FRIEDMAN, B.H., THAYER, J.F.. Anxiety and autonomic flexibility: a cardiovascular approach. **Biol. Psychol.** 47, 243–263. 1998

GARCIA, H. A. C.; FURTADO, C. E.; SONCIN, M. R. S. P.; et al. Diferença comportamental entre potros, machos e fêmeas, cruzados Puro Sangue Inglês e Mangalarga

submetidos a início de cabrestamento e estabulagem. **Revista da FZVA**. Uruguaiana, V. 17, n.2, p. 221-232. 2010.

GEOR, R.J.; HARRIS, P.A.; COENEN, M. **Equine Applied and Clinical Nutrition**. Saunders Elsevier, 2013.

GIBBS, P.G.; POTTER, G.D.; BLAKE, R.W. et al. Milk production of Quarter horse during 150 days of lactation. **Journal of Animal Science**, v.54, n.3, p.497-450, 1982.

GODOI T.L.O.S, VILLAS-BOAS J.D., SOUZA C.C.F., BECK M.M., MOURA G.H.C., LIMA M.T.R.; MEDEIROS M.A. Perfil de atendimento por acupuntura no Hospital Veterinário de Pequenos Animais da UFRRJ-RJ (2006-2016), **Revista Brasileira de Medicina Veterinária** 38(Supl.2):49-56, 2016

GODOI, T. L. O; VILLAS-BOAS, J. D.; ALMEIDA, N. A. D. S.; TRIGO, P. I.;ALMEIDA, F. Q. DE; MEDEIRO , M. A. DE Pharmacopuncture versus acepromazine in stress responses of horses during road transport. **Journal of Equine Veterinary Science**, vol. 34, no. 2, pp. 294–301, 2014.

GOLDSMITH, R.L., BLOOMFIELD, D., ROTTMAN, J., BIGGER, J.T.. Heart rate variability: disagreement on the markers of sympathetic and parasympathetic activities. **J. Am. Coll. Cardiol.** 22, 951–954. 1993.

GOODWIN, D. Horse behaviour: evolution, domestication, and feral- isation. In: Waran, N. (Ed.), **The Welfare of Horses**. Kluwer Academic Publishers, Boston, MA, USA, pp. 1–18. 2002.

GRANDIN, T.; JOHNSON, C. **O bem-estar dos animais: proposta de uma vida melhor para todos os bichos**. Tradução de Angela Lobo de Andrade. Rio de Janeiro: Rocco, 2010, 334 p.

GUIMARÃES, C.M.,PINGE, M.C.M., YAMAMURA, Y., MELLO L.E.A.M.. **Effects of acupuncture on behavioral, cardiovascular and hormonal responses in restraint-stressed Wistar rats**. Braz J Med Biol Res, v.30, n.12, p.1445-50.1997.

GUIRRO, E.C.B.P.; BARBALHO, P.C.; COSTA, M.J.P. Comportamento exploratório de potros e éguas mediante a introdução de novos objetos em seu meio. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.46, n.2, p. 122-129, 2009.

HAINSWORTH, R., The control and physiological importance of heart rate. In: Malik, M., Camm, A.J. (Eds.), **Heart Rate Variability**. Futura Publishing Company, Inc., Armonk, pp. 3–19. 1995.

HAN, J S. Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. **Trends Neurosci**, v. 26, p. 17-22, 2003.

HARMAN, J. C. **Backs, performance and acupuncture**. In: Annual convention of the American association of equine practitioners, v. 39, p. 337-348. 1993.

HELESKI, C. . et al. Influence of housing on weanling horse behavior and subsequent welfare. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 78, n. 2, p. 291–302, 2002.

HELLHAMMER DH, WÜST S, KUDIELKA BM. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. **Psychoneuroendocrinology** 34(2): 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.10.026>.2009.

HENRY, S. et al. Adults may be used to alleviate weaning stress in domestic foals (*Equus caballus*). **Physiology & Behavior**, v. 106, n. 4, p. 428–438, 2012.

HERMAN, J. P., ADAMS, D. & PREWITT, C. M. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. **Neuroendocrinology** 61, 180–190. 1995.

HOFFMAN, R. M. et al. Prewaning diet and stall weaning method influences on stress response in foals. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 10, p. 2922, 1995.

HOSHI, R. A. **Variabilidade da frequência cardíaca como ferramenta de análise da função autonômica: revisão de literatura e comparação do comportamento autonômico e**

metabólico em recuperação pós-exercício. Dissertação. Unesp. 2009.

HOUP, K.A.; HINTZ, H.F.; BUTLER, W.R. A preliminary study of two methods of weaning foals. **Applied Animal Behaviour Science**, n. 12, p. 177-181, 1984.

HOUP, K.A.; McDONNELL, S.M. Equine Stereotypies. **Compendium On Continuing Education For The Practicing Veterinarian**, v.15, n.9, p.1265-1271, 1993.

HOUSEHOLDER, D.D., BRUEMMER, J.E., KOBZA, J.R., LAY, D.C., FRIEND, T.H., Evaluation of a commercial stencil/aerosol-coolant technique for freeze branding horses. **Journal of Equine Veterinary Science** 13, 599–602.1993.

HOUSEHOLDER, D.D., WEBB, G.W., WIGINTON S.; BREUMMER J. E.. Freeze Branding of Horses. **Proc. TAMU Horse Short Course.** Texas A&M University. College Station, Tx. 1992.

HUBER, TJ, ISSA K, SCHIK G, WOLF OT . The cortisol awakening response is blunted in psychotherapy inpatients suffering from depression. **Psychoneuroendocrinology** 31(7):900–904. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.03.005>.2006.

HWANG, Deok-sang et al. Sympathomodulatory effects of Saam acupuncture on heart rate variability in night-shift-working nurses. **Complementary Therapies In Medicine**, [s.l.], v. 19, p.33-40, jan. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ctim.2010.11.001>.

HWANG, Y. C., EGERBACHER, M. **Anatomy and classification of acupoints.** In:_____. SCHOEN, A. M. (Ed.). **Veterinary acupuncture: ancient art to modern medicine.** St. Louis: Mosby, 2001. p. 19-25.

JANKORD, R.; HERMAN, J. P. Limbic regulation of Hypothalamo-pituitary adrenocortical function during acute and chronic stress. **Annals of the New York Academy of Sciences.**v.1148, p.64-73, 2008.

JIANG Y, LI L, LIU B, ZHANG Y, CHEN Q, LI C.. Vagus nerve stimulation attenuates cerebral ischemia and reperfusion injury via endogenous cholinergic pathway in rat. **PLoS One** 9:e102342. 2014.

JIE, Y. et al. Special Topic for 973 Program Function of Moxibustion Therapy in Disease Prevention and Healthcare. **J. Acupunct. Tuina. Sci**, v. 8, n. 4, p. 218–221, 2010.

KATO, Tomohiro et al. Changes in heart rate variability in horses during immersion in warm springwater. **American Journal Of Veterinary Research**, [s.l.], v. 64, n. 12, p.1482-1485, dez. 2003. American Veterinary Medical Association (AVMA). <http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.1482>.

KHALIL, A. M.; KASEDA, Y. Behavioral patterns and proximate reason of young male separation in Misaki feral horses. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 54, n. 4, p. 281–289, 1997.

KILEY-WORTHINGTON, M. Equine Psychological Needs and Quality of Life. McIlwraith; Rollin (Ed.), **Equine Welfare.** Wiley-Blackwell, UK, pp. 94-112. 2011.

KIM Y.S. et al. **The practice of Korean medicine: an overview of clinical trials in acupuncture.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v.2, n.3, p.325- 352, 2005.

KIMURA, Y., HARA, S. The effect of electro-acupuncture stimulation on rhythm of autonomic nervous system in dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v.70, p.349, 2008.

KNARDAHL, S.; ELAM, M.; OLAUSSON, B.; WALLIN, B.G. **Sympathetic nerve activity after acupuncture in humans.** Pain, v. 75, p. 19–25, 1998.

KONDO T.; KAWAMOTO M. Acupuncture and moxibustion for stress-related disorders. **Biopsychosocial Medicine**, 8:7-7, 2014.

KÖNIG VON BORSTEL, U. et al. Equine behaviour and heart rate in temperament tests with or without rider or handler. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 3, p. 454–463, 2011.

KÖNIG, U.; VISSER, E. K.; HALL, C. Indicators of stress in equitation. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 190, p. 43–56, 1, 2017.

KUDIELKA B.M., KIRSCHBAU.M. C. Awakening cortisol responses are influenced by health status and awakening time but not by menstrual cycle phase. **Psychoneuroendocrinology** 28(1):35–47. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(02\)00008-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(02)00008-2). 2003.

KUWAHARA, M., HASHIMOTO, S., ISHII, K., YAGI, Y., HADA, T., HIRAGA, A., KAI, M., KUBO, K., OKI, H., TSUBONE, H., SUGANO, S.. Assessment of autonomic nervous function by power spectral analysis of heart rate variability in the horse. **J. Auton. Nerv. Syst.** 60, 43–48. 1996.

LAY, D.C., FRIEND, T.H., BOWERS, C.L., GRISSOM, K.K., JENKINS, O.C., A comparative physiological and behavioral study of freeze and hot-iron branding using dairy cows. **Journal of Animal Science** 70, 1121–1125. 1992a.

LAY, D.C., FRIEND, T.H., RANDEL, R.D., BOWERS, C.L., GRISSOM, K.K., JENKINS, O.C., Behavioral and physiological effects of freeze or hot-iron branding on crossbred cattle. **Journal of Animal Science** 70, 330–336. 1992b.

LAY, D.C., FRIEND, T.H., RANDEL, R.D., BOWERS, C.L., GRISSOM, K.K., MAL, M.E., Effects of freeze or hot iron branding of Angus calves on some physiological and behavioral indicators of stress. **Applied Animal Behavior Science** 33, 137–147. 1992c

LE FEVRE M, MATHENY J, KOLT GS Eustress, distress, and interpretation in occupational stress. **J Manag Psychol** 18. (7): 726–744. 2003. <https://doi.org/10.1108/02683940310502412>

LEMASSON, A., BOUTIN, A., BOIVIN, S., BLOIS-HEULIN, C., HAUSBERGER, M., Horse (*Equus caballus*) whinnies: a source of social information. **Anim. Cogn.** v12, 693e704. 2009

LI, Q.Q.; LI, G.X.; SHI, Q.; XU, J.; WANG, C.Z.; LIU, A.; WANG, L.P. “Acupuncture effect and central autonomic regulation,” **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 6, 2013.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Piracicaba: CEPEA/ESALQ/USP, 2006. 251p**

LIN, J.H. et al. Sustainable veterinary medicine for the new era. *Revue scientifique et technique* **International Office of Epizootics**, v. 22, n. 3, p. 949-964, 2003.

LINDEGAARD, C. et al. **Transponder Injection in Horses**. v. 70, n. 7, 2009.

LINDEGAARD, C.; ANDERSEN, P. H. The branding iron: A museum exhibit. **Veterinary Journal**, v. 191, n. 2, p. 143–144, 2012.

Lipp, M. E. N. Teorias de tema de vida do stress recorrente e crônico. **Boletim academia paulista de psicologia**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 82-93. 2006

LU, J.; SHAOA, R.H.; HU, L.; TU, Y.; GUO, J.Y. Potential antiinflammatory effects of acupuncture in a chronic stress model of depression in rats. **Neuroscience Letters**, v. 618, p. 31–38, 2016.

LUESCHER, U.A.; McKEOWN, D.B.; HALIP, J. Reviewing the causes of obsessive-compulsive disorder in horses. **Veterinary Medicine**. v. 86, p. 527-531, 1991.

LUNA, S. P. L.; TAYLOR, P. M. 1998. Effect of eletroacupuncture on endogenous opioids, AVP, ACTH, cortisol and catecholamine concentrations measures in the cerebrospinal fluid (CSF), peripheral and pituitary effluente plasma of ponies. In: ANNUAL INTERNATIONAL CONGRESS ON VETERINARY ACUPUNCTURE, 24., 1998, Taiwan. **Proceedings**. Taiwan, I.V.A.S., p. 172-174, 1998.

LUNA, S.P.L.; ANGELI, A.L.; FERREIRA, C.L.; LETTRY, V.; SCOGNAMILLO-SZABO, M. Comparison of Pharmacopuncture, Aquapuncture and Acepromazine for Sedation of Horses. **eCAM**, v. 5, n.3, p.267–272. 2008.

MACCARIELLO, C. E. M.; DE SOUZA, C. C. F. ; MORENA, L. ; DIAS, D. P.MARTINS ; DE MEDEIROS, M. A. . Effects of acupuncture on the heart rate variability, cortisol levels and behavioural response induced by thunder sound in beagles. **Physiology &**

Behavior, p. 37-44, 2018.

MACIOCIA, G. **Fundamentos da medicina chinesa**. São Paulo: ROCA, p.658. 2007.

MACPHERSON, J. W.; PENNER, P. Animal identification. I. Liquid nitrogen branding of cattle. **Canadian journal of comparative medicine and veterinary science**, v. 31, n. 11, p. 271–274, 1967.

MAL, M.E., FRIEND, T.H., LAY, D.C., VOGELSANG, S.G., JENKINS, O.C.. Physiological responses of mares to short-term confinement and isolation. **J. Equine Vet.Sci**, v. 11, p. 96–102, 1991.

MAL, M.E; McCALL, C.A; CUMMINS, K.A; NEWLAND, M.C. Influence of preweaning handling methods on post-weaning learning ability and manageability of foals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 40, p. 187-195, 1994.

MALINOWSKI, K. et al. Effect of different separation protocols between mares and foals on plasma cortisol and cell-mediated immune response. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 10, n. 5, p. 363–368, 1990.

MALLIANI, A., Association of heart rate variability components with physiological regulatory mechanisms. In: Malik, M., Camm, A.J., Armonk, N.Y. (Eds.), **Heart Rate Variability**. Futura, pp. 173–188. 1995

MARCHANT-FORDE, R.M. Heart Rate Variability and Sympathovagal Balance During Normal and Stressed States in Farm Animals. **De Mont- fort University**, Leicester, UK. 2003.

MATSSURA, A.; TANAKA, M.; IRIMAJIRI, M.; YAMAZAKI, A.; NAKANOWATARI, T.; HODATE, K. Heart rate variability after horse trekking in leading and following horses. **Animal Science Journal**, v. 81, p. 618–621. 2010.

MCCALL, C. A.; POTTER, G. D.; KREIDER, J. L. Locomotor, vocal and other behavioral responses to varying methods of weaning foals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 14, n. 1, p. 27–35, 1985.

MCCALL, C.A; POTTER, G.D; KREIDER, J.L; JENKINS, W.L; Physiological responses in foals weaned by abrupt or gradual methods. **Equine Veterinary Science**, v. 7, n.6, p. 368-374, 1987.

MCCUE, P.M. Equine Cushing's disease. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.18, n.3, p. 533-543, 2002.

MCDONALD, J.L.; CRIPPS, A.W.; SMITH P.K. Mediators Receptors, and Signalling Pathways in the Anti-Inflammatory and Antihyperalgesic Effects of Acupuncture. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, CAM** 2015:975632, 2015.

MCGEE, S.; SMITH, H. Accompanying pre-weaned Thoroughbred (*Equus caballus*) foals while separated from the mare during covering reduces behavioural signs of distress exhibited. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 88, n. 1, p. 137–147, 2004.

MCGREEVY, P. **Equine behavior: a guide for veterinarians and equine scientists**. Londres. Saunders, p. 357. 2004.

MERL, S., SCHERZER, S., PALME, R., MÖSTL, E., Pain causes increased concentrations of glucocorticoid metabolites in horse feces. **J. Equine Vet. Sci.** 20, 586–590. 2000.

MILLS, D. S.; ALSTON, R.D.; ROGERS, V.; LONGFORD, N.T. Factors associated with the prevalence of stereotypic behaviour amongst Thoroughbred horses passing through auctioneer sales. **Applied Animal Behaviour Science**, v.78, n. 2- 4, p. 115-124, 2002.

MILLS, D. S.; RIEZEBOS, M. The role of the image of a conspecific in the regulation of stereotypic head movements in the horse. **Applied Animal Behaviour Science**, v.91, n.1- 2, p.155-165, 2005.

MILLS, D.S.; NANKERVIS, K. **Comportamento equino**. São Paulo. Roca, 2005. 213p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Manual de boas práticas de manejo em equideocultura**.p.50. 2017.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Manual do agronegócio do cavalo**. 2016.

MIZOGUCHI, K., ISHIGE, A., ABURADA, M.; TABIRA, T. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. **Neuroscience**, 119, 887–897 2003.

MOLENTO, C.F. M. **Senciência animal**. Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná- CRMV-PR, Curitiba, 2006. Disponível em: < <http://www.labea.ufpr.br/PUBLICACOES/Arquivos/Pginas%20Iniciais%202%20Senciencia.pdf>. > Acesso em: 18 abr. 2014.

MONARD, A.-M.; DUNCAN, P. Consequences of natal dispersal in female horses. **Animal Behaviour**, v. 52, n. 3, p. 565–579, 1996.

MONTEIRO, A. L. R. **Métodos não invasivos de monitoramento de fauna**. 2006. 21 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Júlio de Mesquita Filho, Botucatu. 2006.

MOONS, C. P. H.; LAUGHLIN, K.; ZANELLA, A. J. Effects of short-term maternal separations on weaning stress in foals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 91, n. 3–4, p. 321–335, 2005.

MOREL, M.D.; **Equine reproductive physiology, breeding and stud management**. 2^o edition, Cabi Publishing, New York, 2003. 384p.

MÖSTL, E; PALME, R. Hormones as indicators of stress. **Domestic Animal Endocrinology**, p. 67-74, 23 jul 2002.

MYRTEK, M. Heart and Emotion Ambulatory Monitoring Studies in Everyday Life. [s.l.] **Hogrefe Publishing**, 2004.

MYRTEK, M.; ASCHENBRENNER, E.; BRÜGNER, G. Emotions in everyday life: an ambulatory monitoring study with female students. **Biological Psychology**, v. 68, n. 3, p. 237–255, 2005.

NEWBERRY, R. C.; SWANSON, J. C. Implications of breaking mother–young social bonds. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 110, n. 1, p. 3–23, 2008.

NICOL, C.J., BADNELL-WATERS, A.J., BICE, R., KELLAND, A., WILSON, A.D., HARRIS, P.A.. The effects of diet and weaning method on the behaviour of young horses. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 95, p. 205–221. 2005a.

NICOL, C.J.; BADNELL-WATERS, A.J; Suckling behavior in domestic foals and the development of abnormal oral behavior. **Animal behavior**, v. 70, p. 21-29, 2005 b.

OFTEDAL, O.T.; HINTZ, H.F.; SCHRYVER, H.F. Lactation in the horse: milk composition and intake by foals. **Journal Nutrition**, v.113, p.2196-2206, 1983.

PAGAN, J.D.; HINTZ, H.F. Composition of milk from pony mares fed various levels of digestible energy. **Cornell Veterinarian**, v.76, n.2, p.139-148. 1988.

PARKER, M. et al. Comparison of Polar® heart rate interval data with simultaneously recorded ECG signals in horses. **Comparative Exercise Physiology**, v. 6, n. 4, p. 137–142, 9 nov. 2009.

PARKER, M.; GOODWIN, D.; REDHEAD, E. S. Survey of breeders' management of horses in Europe, North America and Australia: Comparison of factors associated with the development of abnormal behaviour. **Applied Animal Behaviour Science**. v. 114, p. 206-215, 2008.

PELL, S.M.; MCGREEVY, P.D. A study of cortisol and beta-endorphin levels in stereotypic and normal thoroughbreds. **Applied Animal Behaviour Science**, v.64, n.2, p.81-90, 1999.

PELTOLA, M.A. Role of editing of RR intervals in the analysis of heart rate variability, **Front. Physiol.** v.3. p.148. 2012.

PHYSICK-SHEARD, P.W., MARLIN, D.J., THORNHILL, R., SCHROTER, R.C.,

Frequency domain analysis of heart rate variability in horses at rest and during exercise. *Equine Vet. J.* 32, 253–262. 2000.

PITTLER, M.H.; ERNST, E. Effectiveness of Acupuncture in veterinary medicine: systematic review. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.20, n.3, p.480-488, 2006.

PLUHÁČEK, J. et al. Sex of the foetus determines the time of weaning of the previous offspring of captive plains zebra (*Equus burchelli*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 105, n. 1, p. 192–204, 2007.

POLAR EQUINE®. Disponível em:< www.polar.fl/en/products/equine>. Acesso em 10 jan. 2011.

POLLMANN, U. Belastung von Fohlen durch die Kennzeichnung mit Transponder im Vergleich zum Heißbrand. **Tierärztliche Umschau Aktuelle Arbeiten zur Artgemäßen Tierhaltung**, v. 53, n. 380, p. 183–186, 1998.

PROCTOR, H. Animal Sentience: Where Are We and Where Are We Heading?. **Animals**, v. 2, p.628-639, 2012.

PROCTOR, H.; CARDER, G.; CORNISH, A.R. Searching for Animal Sentience: A Systematic Review of the Scientific Literature. **Animals**. v. 3, p. 882-906, 2013

PUMPRLA, J.; HOWORKA, K.; GROVES, D.; CHESTER, M.; NOLAN, J.. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. **Int J Cardiol.** 2002;84(1):1-14.

RANABIR, S.; REETU, K..Stress and hormones. **Indian J Endocrinol Metab** 15(1):18–22. <https://doi.org/10.4103/2230-8210.77573>.2011.

REDBO, I.; REDBOTORSTENSSON, P.; ÖDBERG, O.F.; HEDENDAHL, A.; HOLM, J. Factors affecting behavioural disturbances in race-horses. **Animal Science**, v.66, n.2, p.475-481, 1998.

RIETMANN, T. R.; STAUFFACHER, M.; BERNASCONI, P.; AUER, J. A.; WEISHAUPT, M. A. The Association between Heart Rate, Heart Rate Variability, Endocrine and Behavioural Pain Measures in Horses Suffering from Laminitis.**J. Vet. Med.** ,v. 51 A, p.218–225. 2004a.

RIETMANN, T.R.; STUART, A.E.A.; BERNASCONI, P.; STAUFFACHER, M.; AUER, J.A.; WEISHAUPT, M.A. Assessment of mental stress in warmblood horses: heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters. **J. Appl. Anim. Welf.Sci**, v.88,p. 121–136. 2004b.

RIZZO, M.; ARFUSO, F.; GIANNETTO, C.; GIUDICE, E.; LONGO, F.;BRUSCHETT, D.; PICCIONE, G. Acupuncture Needle Stimulation on Some Physiological Parameters After Road Transport and Physical Exercise in Horse . **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 48, 2017.

ROGERS, C.; GEE, E.; FARAM, T. The effect of two different weaning procedures on the growth of pasture-reared Thoroughbred foals in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 52, n. 6, p. 401–403, dez. 2004.

SAASTAMOINEN, M.T. Serum urea and protein concentrations and growing rates of weanling foals. **Pferdeheikunde**, v.12, n.3, p.323-325, 1996.

SANTOS, Edson Mauro et al. Lactação em éguas da raça Mangalarga Marchador: produção e composição do leite e ganho de peso dos potros lactentes. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa , v. 34, n. 2, p. 627-634, Apr. 2005.

SAXBE, Darby E.; REPETTI, Rena L.; NISHINA, Adrienne. Marital satisfaction, recovery from work, and diurnal cortisol among men and women. **Health Psychology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.15-25, 2008. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/0278-6133.27.1.15>.

SCHMIDEK, A.; OLIVEIRA, J.V.; MIGUEL, F.B. Influência da manipulação de potros ao nascimento sobre o comportamento ao cabrestear. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 8, n. 56,

outubro 2011.

SCHMIDT, A., AURICH, J., MÖSTL, E., MÜLLER, J., AURICH, C.. Changes in cortisol release and heart rate and heart rate variability during the initial training of 3-year-old sport horses. **Hormones and Behavior** 58, 628–636. 2010a.

SCHMIDT, A., BIAU, S., MÖSTL, E., BECKER-BIRCK, M., MORILLON, B., AURICH, J., FAURE, J.-M., AURICH, C., Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport. **Domestic Animal Endocrinology** 38, 179–189. 2010b

SCHMIDT, A., MÖSTL, E., WEHNERT, C., AURICH, J., MÜLLER, J., AURICH, C., Cortisol release and heart rate variability in horse during road transport. **Hormones and Behavior** 57, 209–215. 2010c.

SCHOEN, A.M.. **Acupuntura Veterinária – Da Arte Antiga à Medicina Moderna**. 2ª Ed. São Paulo. Roca. 2006.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN K. S., STOOKEY J. M., PASSILLÉ DE A. M., RUSHEN J. Comparison of hot-iron and freeze branding on cortisol levels and pain sensitivity in beef cattle. **Journal of animal science**. Canada. 369-374. 1997 a

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S. et al. Comparison of Image Analysis, Exertion Force, and Behavior Measurements for Use in the Assessment of Beef Cattle Responses to Hot-Iron and Freeze Branding. **Journal of Animal Science**, v. 76, n. 4, p. 972–979, 1998.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S. et al. Effects of branding on weight gain, antibiotic treatment rates and subsequent handling ease in feedlot cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 77, n. 3, p. 361–367, 1997b.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; STOOKEY, J. M. The use of infrared thermography to assess inflammation associated with hot-iron and freeze branding in cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 77, n. 4, p. 577–583, 1997c.

SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K. S.; STOOKEY, J. M.; WELFORD, R. Behavior of Cattle during Hot-Iron and Freeze Branding and the Effects on Subsequent Handling Ease. **Journal of Animal Science**, v. 75, n. 8, p. 2064–2072, 1997.

SCOGNAMILLO-SZABÓ, M.V.R. et al. Breve histórico da acupuntura veterinária no Brasil e sua prática no Estado de São Paulo. **MEDVEP – Revista Científica de Medicina Veterinária - Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.4, n.11, p.61-65, 2006.

SHAFFER, F.; GINSBERG, J. P. An Overview of Heart Rate Variability Metrics and Norms. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. September, p. 1–17, 2017.

SIGHIERI, C; BARAGLIP, P.; TACCINI, V.; MÖSTL, E.; NICOL, C.J. Dosaggio del cortisolo fecale in cavalli addestrati con tecnica etologica e tradizionale, SO.FI.Vet, VI., Stintino. **Anais... Stintino: Congresso nazionale SO.FI Vet**, 2005. 4 p.2005.

SMYTH, J.M., et al.. Individual differences in the diurnal cycle of cortisol. **Psychoneuroendocrinology** 22(2):89–105. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(96\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(96)00039-X).1997.

SOLIGO, M.; NORI, S. L. L.; PROTTO, V.; FLORENZANO, F., MANNI, L. Acupuncture and neurotrophin modulation, in *Neurobiology of Acupuncture: 111 International Review of Neurobiology*, B.-Y. Zeng, K. Zhao, and F.-R. Liang, Eds.; Academic Press, London, UK, 2013. Q.-Q. Li, G.-X. Shi, Q. Xu, J. Wang, C.-Z. Liu, and L.-P. Wang, “Acupuncture effect and central autonomic regulation,” **Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 6 pages, 2013.

SOLLERS J. J., BUCHANAN T. W., MOWRER S. M., HILL L. K., THAYER J. F., “Comparison of the ratio of the standard deviation of the r-r interval and the root mean squared successive differences (SD/rMSSD) to the low frequency-to-high frequency (LF/HF) ratio in a patient population and normal healthy controls,” **Biomedical Sciences Instrumentation**, vol. 43, pp. 158–163, 2007

SPARROW, Kristen; GOLIANU, Brenda. Does Acupuncture Reduce Stress Over Time? A Clinical Heart Rate Variability Study in Hypertensive Patients. **Medical Acupuncture**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.286-294, out. 2014. Mary Ann Liebert Inc.
<http://dx.doi.org/10.1089/acu.2014.1050>.

SPINDOLA, B.F. **Comportamento e resposta inflamatória (TNF- α) em potros Mangalarga Marchador ao desmame**. 2013. 67p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

STEIN, P. K. et al. Heart rate variability: A measure of cardiac autonomic tone. **American Heart Journal**, v. 127, n. 5, p. 1376–1381, 1994.

STRZELEC, K.; KANKOFER, M.; PIETRZAK, S.. Cortisol concentration in the saliva of horses subjected to different kinds of exercise. **Acta Veterinaria Br** no, 2011.

STUCKE, D.; GROSSE RUS, M.; LEBELT, D. Measuring heart rate variability in horses to investigate the autonomic nervous system activity – Pros and cons of different methods. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 166, p. 1–10, 1 maio 2015.

TASK-FORCE, 1996. **Heart rate variability: standards of measurement physiological interpretation, and clinical use**. Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing. *Circulation* 93,1043–1065, 1996.

THAYER, J.F., HAHN, A.W., PEARSON, M.A., SOLLERS, J.J., JOHNSON, P.J., LOCH, W.E. Heart rate variability during exercise in the horse. *Biomed. Sci. Instrum.* 34, 246–251. 1997.

TILLER, W.A., MCCRATY, R., ATKINSON, M. Cardiac coherence: a new, noninvasive measure of autonomic nervous system order. *Altern. Ther. Health Med.* 2, 52–65. 1996.

TSIGOS, C., KYROU, I., KASSI, E., et al. **Stress, Endocrine Physiology and Pathophysiology**. [Updated 2016 Mar 10]. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278995/>

TURNER, J.L.; ARNS, M.J.; MINTON, J.E.; PRUITT, J.A.; Effects of abrupt VS. gradual weaning on cortisol and immune function responses of foals. **The Professional Animal Scientist**, n. 19, p. 55-61, 2003.

ULRICH-LAI, Y. M. et al. Limbic and HPA axis function in an animal model of chronic neuropathic pain. **Physiol. Behav.** 88, 67–76 2006.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, L. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v.10, p. 397-409.2009.

VAN BREDA, E. A Nonnatural Head–Neck Position(Rollkur) During Training Results in Less Acute Stress in Elite, Trained, Dressage Horses. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 9, issue 1, 2006.

VAN CAUTER, E.; LEPROULT, R.; KUPFER, D.J. Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. **J Clin Endocrinol Metab** 81(22):2468–2473. <https://doi.org/10.1210/jcem.81.7.8675562>.1996.

VANDERLEI, L. C. M. et al. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 24, n. 2, p. 205–217, jun. 2009.

VILLAS-BOAS, J. D. et al. Acupuncture affects autonomic and endocrine but not behavioural responses induced by startle in horses. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

VILLAS-BOAS, J. D. et al. Behavioural, endocrine and cardiac autonomic responses to a model of startle in horses. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 174, p. 76–82, 2016.

VISSER, E.K., VAN REENEN, C.G., VAN DER WERF, J.T.N., SCHILDER, M.B.H.,

KNAAP, J.H., BARNEVELD, A., BLOKHUIS, H.J. Heart rate and heart rate variability during a novel object test and a handling test in young horses. **Physiol. Behav.** 76, 289–296. 2002.

VOGEL, J. H. K.; BOLLING, S. F.; COSTELLO, R. B. “Integrating complementary medicine into cardiovascular medicine: a report of the American college of cardiology foundation task force on clinical expert consensus documents (Writing Committee to Develop an Expert Consensus Document on Complementary and Integrative Medicine),” **Journal of the American College of Cardiology**, v. 46, no. 1, p. 184–221, 2005.

VON BORELL, E. et al. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals - A review. **Physiology and Behavior**, v. 92, n. 3, p. 293–316, 2007.

WANG, J. D.; KUO, T. B. J.; YANG, C. C. H. “An alternative method to enhance vagal activities and suppress sympathetic activities in humans,” **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 100, no. 1-2, p. 90–95, 2002.

WARAN, N. K.; CLARKE, N.; FARNWORTH, M. The effects of weaning on the domestic horse (*Equus caballus*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 110, n. 1, p. 42–57, 2008.

WARING, G. H. **Horse behavior**. [s.l.] Noyes Publications, 2003.

WATERS, A.J.; NICOL, C.J.; FRENCH, N.P. Factors influencing the development of stereotypic and redirected behaviours in young horses: findings of a four years prospective epidemiological study. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n.6, p. 572-579, 2002.

WEARY, D. M.; JASPER, J.; HÖTZEL, M. J. Understanding weaning distress. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 110, n. 1, p. 24–41, 2008.

WEEKS, J. . et al. Aggression and social spacing in light horse (*Equus caballus*) mares and foals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 68, n. 4, p. 319–337, 2000.

WESSA M.; ROHLEDER N.; KIRSCHBAUM C.; FLOR H. Altered cortisol awakening response in posttraumatic stress disorder. **Psychoneuroendocrinology** 31(2):209–215. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.06.010>.2006.

WILLNER, P. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioral neurobiological concordance in the effects of CMS. **Neuropsychobiology**, v.52, p.90-110,2005.

WULF, M. et al. The stress response of 6-month-old horses to abrupt weaning is influenced by their sex. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 23, p. 19–24, 1 jan. 2018.

XIE, Huisheng; PREAST, Vanessa. **Traditional Chinese Veterinary Medicine: Fundamental Principles**. 2. ed. [s. l.]: Chi Institute, 2013. 481 p.

YARNELL, K., HALL, C., BILLETT, E.. An assessment of the aversive nature of an animal management procedure (clipping) using behavioral and physiological measures. **Physiol. Behav.** 118, 32–39. 2013.

ZEBISCH, A., MAY, A., REESE, S., GEHLEN, H.,. Effect of different head–neck positions on physical and psychological stress parameters in the ridden horse. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.** 97, 1–7. 2013.

ZHANG, A.; SUN, H.; YAN, G.; CHENG, W.; WANG, X. Systems biology approach opens door to essence of acupuncture. **Complementary therapies in medicine** 21:253-259. 2013.

ZHAO, Z. Q. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. **Progress in neurobiology** 85:355-375. 2008.

ANEXO A



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Comparação das respostas de estresse de marcação a quente versus marcação à frio em potros do setor de Equinos da UFRRJ", protocolada sob o CEUA nº 2640020517, sob a responsabilidade de **Magda Alves de Medeiros e equipe; Tatianne Leme Oliveira Santos Godoi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 22/08/2017.

We certify that the proposal "Comparison of the stress responses induced by hot marking versus cold marking in foals of the equines sector of UFRRJ", utilizing 36 Equines (males and females), protocol number CEUA 2640020517, under the responsibility of **Magda Alves de Medeiros and team; Tatianne Leme Oliveira Santos Godoi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 08/22/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [07/2017](#) a [06/2020](#)

Área: [Ciências Fisiológicas](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Equídeos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [20 a 28 semanas](#)

N: [36](#)

Linhagem: [Mangalarga Machador e mestiços](#)

Peso: [100 a 280 kg](#)

Resumo: Marcar cavalos com sinais permanentes ainda é uma rotina de muitos criatórios e associações no Brasil. Estas marcações são utilizadas com propósitos de identificação, seja da propriedade ou da associação na qual pertença o animal, ou em programas genéticos de melhoramento, em controle de doenças, ou por diversos outros propósitos. Essa identificação tem sido feita tradicionalmente com ferro quente e com símbolos específicos. Porém tem sido amplamente divulgada a marcação à frio, com nitrogênio líquido, como um método que gera menos dor e consequentemente colabore com o bem estar do animal. Mais recentemente tem sido utilizada a identificação por microchip. Sendo assim tradicionalmente ainda se utiliza a marcação à quente, juntamente com o uso do microchip. Os animais do criatório de Equinos da UFRRJ são tradicionalmente são marcados ferro candente. Frequentemente são notados a formação de feridas e o aparecimento de milases no local. Com o objetivo de compararmos qual tipo de marcação (a quente ou a frio) induz menores níveis de estresse e melhor qualidade de marcação, iremos avaliar os parâmetros fisiológicos antes, durante e após a marcação com nitrogênio líquido e com ferro candente nos potros do criatório de Equinos da UFRRJ. Nosso projeto prevê a utilização dos potros do criatório de Equinos da UFRRJ, e a avaliação de parâmetros autonômicos como a Variabilidade do intervalo cardíaco, endócrinos como o Cortisol Sérico, comportamentais e a avaliação da cicatrização da ferida. Desta forma, objetivando o bem estar animal e considerando a necessidade de identificação dos animais o presente projeto pode sugerir formas de marcação menos dolorosas e estressantes para os animais.

Local do experimento: Setor de Equinocultura da UFRRJ

Seropédica, 22 de agosto de 2017

Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

ANEXO B



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da acupuntura nas repostas de estresse induzidas pelo desmame abrupto em potros da UFRRJ.", protocolada sob o CEUA nº 9316020517, sob a responsabilidade de **Magda Alves de Medeiros e equipe; Tatianne Leme Oliveira Santos Godoi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) na reunião de 22/08/2017.

We certify that the proposal "Effect of acupuncture on stress responses induced by abrupt weaning in UFRRJ foals.", utilizing 42 Equines (males and females), protocol number CEUA 9316020517, under the responsibility of **Magda Alves de Medeiros and team; Tatianne Leme Oliveira Santos Godoi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Veterinary Institute of Rural Federal University of Rio de Janeiro (CEUA/UFRRJ) in the meeting of 08/22/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [07/2017](#) a [06/2021](#)

Área: [Ciências Fisiológicas](#)

Origem: [Não aplicável biotério](#)

Espécie: [Equídeos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [24 a 32 semanas](#)

N: [42](#)

Linhagem: [Mangalarga Machador e mestiços](#)

Peso: [100 a 300 kg](#)

Resumo: O desmame dos equinos é um processo que gera um estresse físico e psicológico. Este processo representa ao potro, um afastamento materno, mudanças na alimentação com a privação do leite materno, alteração de ambiente e manejo, ocasionando ao mesmo muitas situações novas às quais os potros devem se adaptar. O desmame, se não for bem conduzido, pode gerar uma queda de imunidade tornando o animal mais susceptível a doenças e infecções. A acupuntura tem sido uma ferramenta da medicina complementar muito utilizada na redução de estresse. A acupuntura baseia-se no princípio de manter ou recuperar a homeostase. Este procedimento visa à prevenção e cura das enfermidades pela aplicação de estímulos através da pele, com a inserção de agulhas em pontos específicos chamados acupontos. O presente estudo tem por finalidade reduzir este primeiro grande estresse e ajudar na implementação do bem-estar nos potros da UFRRJ, recém-desmamados, com idades variando de 24 a 32 semanas. Antecedendo o desmame serão realizadas sessões de acupuntura em dias alternados, iniciando sete dias antes. Os animais serão divididos em três grupos de tratamentos, com a média catorze animais em cada grupo. Os grupos serão: grupo 1 (Controle), os animais permanecerão por 20 minutos sem qualquer manipulação; grupo 2 (Acupuntura falsa), os animais receberão agulhas de metal 0.30x40 mm da marca Dongbang, com a profundidade de 0,2 cm, localizados a uma distância de 2 cm dos pontos VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1 não sendo coincidentes com outros pontos de acupuntura; grupo 3 (Acupuntura), os animais receberão agulhas de metal 0.30x40 mm, marca Dongbang com a profundidade de 0,2 cm nos pontos VG16, B49, B23, B52, Bai Hui, VG1. No presente estudo todos os integrantes dos grupos serão avaliados quanto a variabilidade da frequência cardíaca, cortisol sérico e fecal, perfil plasmático das citocinas (IFN- γ , TNF- γ e IL-10). Os resultados serão correlacionados a análise dos vídeos do comportamento dos potros que após desmamados de forma abrupta, serão condicionados e mantidos em piquete coletivo. As coletas de sangue, fezes e aferição da variabilidade da frequência cardíaca serão realizadas dentro do intervalo de 22 dias.

Local do experimento: Setor de equinocultura- - Fazenda da UFRRJ

Seropédica, 22 de agosto de 2017



UFRRJ
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**
Instituto de Veterinária



Prof. Dr. Fabio Barbour Scott
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro

Prof. Dr. Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro