

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

DISSERTAÇÃO:

**Efeitos da Acupuntura na Variabilidade da Frequência
Cardíaca e no Comportamento de Cães Submetidos ao
Estresse Sonoro Agudo**

Carolina Elisabetta Martins Maccariello

2012



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

**Efeitos da Acupuntura na Variabilidade da Frequência Cardíaca
e no Comportamento de Cães Submetidos ao
Estresse Sonoro Agudo**

CAROLINA ELISABETTA MARTINS MACCARIELLO

Sob a Orientação da Professora

Magda Alves de Medeiros

Seropédica, RJ

Maio de 2012



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

**EFEITOS DA ACUPUNTURA NA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA
CARDÍACA E NO COMPORTAMENTO DE CÃES SUBMETIDOS AO
ESTRESSE SONORO AGUDO**

CAROLINA ELISABETTA MARTINS MACCARIELLO

Sob a Orientação da Professora

Magda Alves de Medeiros

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

Seropédica, RJ

Maior de 2012

636.0895892

M123e

T

Maccariello, Carolina Elisabetta Martins,
1975-

Efeitos da acupuntura na variabilidade da frequência cardíaca e no comportamento de cães submetidos ao estresse sonoro agudo / Carolina Elisabetta Martins Maccariello - 2012.

87 f.: il.

Orientador: Magda Alves de Medeiros.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária.

Bibliografia: f. 66-75.

1. Acupuntura veterinária - Teses. 2. Cão - Doenças - Tratamento - Teses. 3. Cão - Efeito do stress - Teses. 4. Cão - Comportamento - Teses. I. Medeiros, Magda Alves de, 1973-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.

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

CAROLINA ELISABETTA MARTINS MACCARIELLO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM __/__/____

Magda Alves de Medeiros (Ph. D) UFRRJ
(Orientadora)

Luis Carlos Reis (Ph. D) UFRRJ

Márcia Valéria Rizzo Scognamillo Szabó (Ph. D)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus anjos
Carolzinha e Claudinho.
E a todos que não deixam
seu lado criança desaparecer,
agindo espontaneamente e com sinceridade
estando abertos assim,
para novas percepções.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Magda Alves de Medeiros, por ter acreditado em minhas idéias e ter confiado que conseguiríamos realizar esse trabalho apesar de todas as adversidades, me guiando pelos caminhos, muitas vezes difíceis, com boa vontade e amizade.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade em aceitar nosso convite.

A minha mãe, Maria do Carmo Martins Maccariello e ao meu pai, Antonio Maccariello que com seu amor e alegria sempre me incentivaram a seguir em frente em todos os sentidos da vida e me inspiraram a ter sempre boa vontade e coragem para procurar o conhecimento e acreditar nos meus sentimentos e idéias.

Aos meus pequenos anjos, Carolzinha e Claudinho, que fizeram nascer o amor mais sublime em meu coração. Além de encherem minha vida de alegria, a eles devo a conquista de ser Médica Veterinária.

Aos meus irmãos Fabio e Rafael, por todos os momentos maravilhosos e carinho nos momentos difíceis.

A Claudio Marchiori pela ajuda em adquirir os arquivos sonoros e pela aparelhagem de som utilizada no experimento. Muito obrigada por tudo e pela sua compreensão.

Agradeço especialmente ao mestre Renato Castanheira, por disponibilizar o decibelímetro e por me ensinar, com toda boa vontade, a utilizá-lo e pelas conversas e ótimas idéias.

A meus queridos amigos: André Mecawi, Fabrícia Fonseca, Iracema Araújo, Raquel Nascimento e Eglegiane Rocha, Anne Marie Yasui e Julia Villas Boas, muito obrigada pelo apoio e amizade nos momentos em que eu mais precisava. A Laura Morena que “caiu do céu” e disponibilizou sua preciosa ajuda se tornando também, uma grande amiga. A Lucas Marinho, Felipe Vianna, Anderson, Monique (Chuchu), Cássio e Bruno que me ajudaram e deram força, com sua amizade, durante a parte prática do trabalho.

Muito obrigada amigos, a todos vocês que estiveram comigo nessa etapa, pelas ótimas idéias e apoio nessa jornada linda porém cheia de caminhos e escolhas que sem a sua amizade e carinho seria árdua demais.

As minhas queridas Ana Lúcia, Ana Paula, Bianca e Fabia, desde crianças, sempre irmãs.

A Otacílio Fernandes por sua maravilhosa presença de espírito e carinho em todos os momentos.

A Márcia Orrico por sua amizade e seu carinho. Sua luz ajudou a iluminar meus caminhos, muito obrigada querida!

A todos os meus queridos mestres que participaram dessa etapa de minha formação, em especial a Luis Reis, Pablo Trigo, Thaís e Fred por seus preciosos esclarecimentos às minhas dúvidas e questões e sua boa vontade e disposição de ajudar em todos os momentos.

Aos mestres Fabio Scott e Laerte Grisi por disponibilizarem os animais e o local para realização do experimento, e por estarem sempre dispostos a ajudar em todos os momentos do trabalho.

Agradeço especialmente a Lorena, Regina, Vicente, Franklín e Maria Rita sempre dispostos a darem seu apoio.

Finalmente agradeço a essa força maravilhosa que nos guia e se faz sentir, principalmente quando mais precisamos.

*A REAL VIAGEM DO DESCOBRIMENTO
NÃO CONSISTE EM VISITAR NOVAS PAISAGENS,
MAS EM OLHAR COM NOVOS OLHOS.*

MARCEL PROUST

RESUMO

MACCARIELLO, Carolina Elisabetta Martins. **Efeitos da acupuntura na variabilidade da frequência cardíaca e no comportamento em cães submetidos ao estresse sonoro agudo.** 2012. 87p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O estudo das respostas autonômicas e comportamentais em cães submetidos a um modelo de estresse se mostra de grande importância na atualidade, uma vez que animais e humanos são constantemente submetidos a situações de estresse no seu cotidiano. Vários estímulos podem ser considerados geradores de estresse como áreas em que há aglomeração de pessoas ou de animais e sons de fogos de artifício e de trovões. A exposição continuada e repetida a tais estímulos pode afetar o bem-estar e a saúde dos cães. A acupuntura é uma das terapias da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) que visa o tratamento e a prevenção de distúrbios fisiológicos e comportamentais induzidos pelo estresse, porém há poucos estudos na literatura sobre a sua eficácia e aos seus mecanismos de ação. O presente estudo teve como objetivo avaliar o balanço simpato-vagal, através da análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) e 14 parâmetros comportamentais em resposta ao estresse sonoro agudo em cães saudáveis tratados com acupuntura. Desta forma, foram utilizados 24 cães da raça Beagle divididos em três grupos de 8 animais cada: o primeiro grupo controle não recebeu tratamento (CTL), o segundo grupo controle recebeu tratamento por acupuntura em pontos não correspondentes aos utilizados na MTC (NP) e o terceiro recebeu acupuntura nos pontos VG20, *Yintang*, Pc6, C7 e E36 (ACUP). Os tratamentos tiveram duração de 20 minutos e em seguida os animais foram submetidos a um modelo de estresse agudo que consistiu de estímulo sonoro (som de trovão) com intensidade de 103-104 dB e duração de 2,5 minutos. Os resultados da análise da VFC demonstraram que durante o estímulo sonoro a acupuntura significativamente reduziu a razão LF/HF e FC média em relação aos grupos NP e CTL. O grupo NP também apresentou valores significativamente menores da razão LF/HF em relação ao CTL no momento do estresse, apresentando valores intermediários entre os grupos CTL e ACUP. Na análise comportamental, a ACUP quando comparado ao grupo CTL apresentou escores comportamentais significativamente menores de arfar, se esconder, inquietação, disparada, fugir da sala e sobressalto; e quando comparado ao grupo NP, a ACUP reduziu os escores comportamentais de se esconder, disparada, sobressalto e fugir da sala. Além de reduzir significativamente os parâmetros de arfar e disparada em relação ao CTL, o grupo NP produziu escores intermediários entre CTL e ACUP. A análise destes dados demonstra que o tratamento com acupuntura promoveu redução do balanço simpato-vagal provavelmente através de uma inibição simpática associada à estimulação parassimpática, além de produzir redução das respostas comportamentais de luta e fuga características de estresse.

Palavras-chaves: acupuntura, cão, variabilidade da frequência cardíaca, comportamento.

ABSTRACT

MACCARIELLO, Carolina Elisabetta Martins. **Effects of acupuncture on the heart rate variability and behavior in dogs submitted to acute noise stress.** 2012. 87p. Dissertation (Master in Veterinary Medicine). Institute of Veterinary, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

The study of autonomic and behavioral responses in dogs subjected to a stress model is crucial at the present time, since animals and humans are constantly subjected to stress in their daily lives. Several stimuli can generate stress in dogs, as areas with crowded of people or animals and sounds of fireworks and thunder. The continuous and repeated exposure to these situations can affect the welfare and health of dogs. The Acupuncture is one of the therapies of Traditional Chinese Medicine (TCM) that targets the prevention and treatment of behavioral and physiological disorders induced by stress, however there are few studies about its efficacy and its mechanisms of action. The present study aimed to evaluate the sympathetic-vagal balance through the analysis of Heart Rate Variability (HRV) and 14 behavioral parameters in response to an acute sound stress in healthy dogs treated with acupuncture. Therefore, we used 24 beagle dogs divided into three groups of 8 animals each: one control group received no treatment (CTL), the second control group received acupuncture treatment at points not corresponding to those used in TCM (NP) and the third group received acupuncture at acupoints VG20, *Yintang*, PC6, C7 and E36 (ACUP). The treatments lasted 20 minutes and then the animals were subjected to an acute stress model consisting of a sound stimulus (thunders) with intensity of 103-104 dB and duration of 2.5 minutes. The results of HRV analysis showed that during the stress stimulus, acupuncture significantly reduced the LF/HF ratio and the heart rate (HR) compared to NP and CTL. The NP group also had significantly lower LF/HF ratio compared to the CTL during the stress, showing intermediate values between the CTL and ACUP groups. In the behavioral analysis, when compared to CTL group, ACUP showed significantly lower behavioral scores of panting, restlessness, hiding, bolt, startle and escape of the room; and when compared to the NP, ACUP reduced the behavioral scores of hiding, bolt, startle and escape of the room. In addition to reducing significantly the parameters of panting and bolt when compared to the CTL group, the NP group produced intermediate scores between CTL and ACUP groups. The analysis of these data shows that acupuncture treatment promoted reduction of sympatho-vagal balance probably through a sympathetic inhibition associated to parasympathetic stimulation, as well as producing a reduction of behavioral responses of fight and flight characteristics of stress.

Keywords: acupuncture, dog, heart rate variability, behavior.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: relação das respostas de estresse e os respectivos distúrbios relacionados.....	p.21
Tabela 2: Descrição dos 14 parâmetros comportamentais analisados.....	p.40
Tabela 3: Respostas comportamentais de cães submetidos ao estresse sonoro agudo.....	p.47
Figura 1: Ativação simpato-adrenomedular (SAM) e do eixo do HPA como sistemas primários para a manutenção e restabelecimento da homeostase.....	p.10
Figura 2: Efeito do sistema nervoso autônomo sobre a atividade cardíaca.....	p. 15
Figura 3: Modelo simplificado da formação da VFC e da estrutura de controle cardiovascular	p.17
Figura 4: Análise espectral da VFC em um indivíduo jovem durante o repouso e quando em movimento.....	p.19
Figura 5: Esquema do protocolo experimental.....	p.29
Figura 6: Localização dos pontos de acupuntura utilizados no tratamento do grupo ACUP.	p.32
Figura 7: Fotografia ilustrando a localização dos não pontos.....	p.33
Figura 8: Decibelímetro modelo BK Precision 732A Sound Level Meters	p.34
Figura 9: Gráfico do arquivo sonoro utilizado, apresentado em dB na razão do tempo.....	p.35
Figura 10: Componentes do Polar modelo RS800CX.....	p.36
Figura 11: Tela inicial do programa Polar Pro Trainer 5®.....	p.36
Figura 12: Gráfico confeccionado pelo programa Polar Pro Trainer 5®.....	p.37
Figura 13: Tela do programa HRV analysis	p.38
Figura 14: Página gerada pelo programa HRV analysis com os valores dos parâmetros da análise da VFC no domínio da frequência e no domínio do tempo.....	p.39
Figura 15: Efeito da acupuntura na razão entre os componentes frequenciais LF/HF de cães submetidos ao estresse sonoro agudo.....	p.43
Figura 16: Efeito da acupuntura no STDRR (Desvio padrão de todos os intervalos RR do segmento) (A) e no RMSSD (raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos entre batimentos consecutivos elevadas ao quadrado) (B) de cães submetidos ao estresse sonoro agudo.....	p.44
Figura 17: Efeito da acupuntura na FC média (Frequência Cardíaca Média) de cães submetidos ao estresse sonoro agudo.....	p.45

Figura 18: Efeito da acupuntura no parâmetro comportamental arfar de cães submetidos ao estresse sonoro agudo.....	p.48
Figura 19: Efeito da acupuntura no parâmetro comportamental se esconder de cães submetidos ao estresse sonoro agudo.....	p.49
Figura 20: Efeito da acupuntura no parâmetro comportamental inquietação de cães submetidos ao estresse sonoro agudo.....	p.50
Figura 21: Efeito da acupuntura no parâmetro comportamental se esconder de cães submetidos ao estresse sonoro agudo.....	p.51
Figura 22: Efeito da acupuntura no parâmetro comportamental fugir da sala de cães submetidos ao estresse sonoro agudo.....	p.52
Figura 23: Efeito da acupuntura no parâmetro comportamental sobressalto de cães submetidos ao estresse sonoro agudo.....	p.53

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC: Adenilatociclase;
ACh: Acetilcolina;
ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico;
ACUP: Grupo tratado com pontos específicos de acupuntura;
AVP: Vasopressina;
CCP: Corpos Celulares Pré-ganglionares;
COMEP: Comitê de Ética na Pesquisa
CRH: Hormônio liberador de corticotropina;
CTL: Grupo controle, não tratado;
dB: decibéis;
DCF: Departamento de Ciências Fisiológicas;
DPA: Departamento de Parasitologia Animal;
EA: Eletroacupuntura;
FC: Frequência Cardíaca;
FFT: Transformada Rápida de Fourier;
GR: Receptor de Glicocorticóides;
HF: Frequência alta;
HHA: Eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal;
IRR: Intervalos cardíacos RR;
LF: Frequência baixa
MR: Receptor de Mineralocorticóide;
MTC: Medicina Tradicional Chinesa;
NAV: Nodo Átrioventricular;
NA: Noradrenalina;
NP: Grupo tratado com não pontos;
NS: Nodo Sinoatrial;
PKA: Proteína quinase dependente de AMPc;
PVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo;
RMSSD: raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos entre batimentos consecutivos elevadas ao quadrado;

SAM: Sistema Simpato-adreno-medular;

SNA: Sistema Nervoso Autônomo;

SNC: Sistema Nervoso Central;

SNP: Sistema Nervoso Parassimpático;

SNS: Sistema Nervoso Simpático;

STDRR: Desvio padrão de todos os intervalos RR do segmento;

UFRRJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro;

VFC: Variabilidade da Frequência Cardíaca.

Sumário

DEDICATÓRIA.....	vi
AGRADECIMENTOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO.....	3
1.1 Justificativa.....	5
1.2 Objetivos.....	6
1.2.1 Geral	6
1.2.2. Específicos.....	6
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Conceito de Estresse.....	7
2.2 Agentes Estressores	8
2.3 Homeostase e Alostase	8
2.4 O sistema de Estresse	9
2.5 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA)	11
2.6. Regulação, Interpretação e Significância da Variabilidade da Frequência Cardíaca Durante o Estresse	13
2.6.1 Regulação autonômica da atividade cardíaca.....	13
2.6.2 A Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	16
2.6.3 A análise espectral da Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	18
2.7. Alterações Decorrentes do Estresse em Cães	20
2.8 O Estresse Sonoro em Cães	22
2.9 Acupuntura – Terapia Integrante da Medicina Tradicional Chinesa.....	24
2.10 Acupuntura na Redução das Respostas de Estresse	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Local de Execução do Trabalho Experimental.....	28
3.2 Animais.....	28
3.3 Procedimentos Experimentais	28
3.4 Coleta e Manipulação das Amostras de Sangue.....	30

3.5 Tratamentos	30
3.6 Estímulo Sonoro	35
3.7 Uso dos Frequencímetros	36
3.8 Análise Espectral da VFC	37
3.9. Análise Comportamental	40
3.10. Análise Estatística	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	43
4.2. Análise Comportamental	47
5 DISCUSSÃO	55
5.1 O Modelo de Estresse Sonoro Agudo em Cães.....	55
5.2 Acupuntura e Estresse	59
6 CONCLUSÕES	65
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8 ANEXOS	77
8.1. Ficha de Protocolo Experimental	77

1 INTRODUÇÃO

Na sociedade moderna há um elevado número de situações potencialmente indutoras de medo e estresse. Quando um indivíduo reage a estas situações o organismo redistribui sua energia e, conseqüentemente, o sistema locomotor e o sensorial são priorizados em detrimento de outros (reprodutivo, digestivo e imune). A persistência destas situações leva ao estresse crônico e tende a causar prejuízo aos sistemas deprimidos.

No caso dos cães, o estresse sonoro leva diversos indivíduos a sofrerem alterações comportamentais e neuroendócrinas que podem evoluir para graves distúrbios comportamentais e fisiológicos. Em alguns casos de estresse crônico severo, podem ocorrer danos neurais irreversíveis. Em outros casos, o estresse pode levar ao aparecimento de doenças gastrointestinais, além da diminuição da resposta imune.

Os níveis de estresse podem ser avaliados através da mensuração de certos parâmetros fisiológicos e comportamentais. Em várias espécies, o parâmetro mais utilizado é a dosagem de cortisol plasmático. A análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) vem se mostrando um parâmetro importante e não invasivo para avaliar a ativação do Sistema Nervoso Simpático (SNS) em indivíduos submetidos a estímulos potencialmente desafiadores. As alterações comportamentais são estudadas, preferencialmente, em conjunto com as alterações neuroendócrinas.

Recentemente, têm sido estudadas alternativas terapêuticas para diminuir as reações deletérias ao organismo ocasionadas pelas respostas aos estímulos estressores. Isso ocorre, porque os medicamentos convencionalmente utilizados para distúrbios decorrentes do estresse podem causar dependência e produzem diversos efeitos colaterais indesejados.

A acupuntura é uma das terapias utilizadas na Medicina Tradicional Chinesa (MTC) com aplicações terapêuticas no tratamento e prevenção de diversas doenças, tanto as relacionadas a distúrbios fisiológicos como as comportamentais. Esta terapia vem sendo utilizada amplamente em casos de alterações comportamentais e físicas decorrentes do estresse em humanos e, mais recentemente, também em animais. Além disso, a técnica possui a vantagem de não produzir os efeitos colaterais observados no tratamento convencional.

Segundo a teoria da Medicina Tradicional Chinesa, a acupuntura estimula pontos específicos que leva o organismo a reagir sempre em direção ao equilíbrio homeostático.

Entretanto, há poucos estudos a respeito de seus benefícios em relação às alterações decorrentes de estímulos geradores de estresse.

O presente estudo teve como objetivo avaliar as respostas autonômicas e comportamentais induzidas pelo estresse sonoro agudo em cães saudáveis tratados com acupuntura. O modelo de estresse utilizado consiste em um método não invasivo e seguro, uma vez que cada animal foi submetido a um estímulo sonoro (sons de trovão) de curta duração (2,5 min), a uma intensidade sonora máxima de 103,9 dB, não sendo capaz de causar efeitos deletérios para os animais.

Com esse objetivo, foram utilizados 24 cães da raça Beagle divididos em três grupos. Um grupo foi tratado com acupuntura (ACUP) nos pontos VG20, *Yintang*, Pc6, C7; o segundo grupo foi tratado acupuntura em regiões que não são considerados pontos de acupuntura (não pontos) (NP); e o terceiro o grupo não recebeu tratamento (CTL). Foram avaliados o balanço simpato-vagal através da mensuração da VFC e 14 parâmetros comportamentais segundo descrito por Mills et al., 2003.

1.1 Justificativa

Animais e humanos são constantemente submetidos a situações de estresse no seu cotidiano. Em cães vários estímulos podem ser considerados geradores de estresse, como áreas em que há aglomeração de pessoas ou de animais; congestionamentos e sons de fogos de artifício e de trovão. Como a repetição excessiva da situação estressante ou a resposta de estresse exacerbada podem produzir graves distúrbios físicos e mentais, é fundamental que estas situações sejam evitadas e/ou que as respostas de estresse sejam controladas, visando o bem-estar canino.

A acupuntura vem sendo utilizada amplamente na prevenção e no tratamento de distúrbios comportamentais e físicos decorrentes de estresse, porém há poucos estudos na literatura a respeito dos mecanismos envolvidos nestes benefícios. Além disso, não existem relatos ocidentais sobre o efeito da acupuntura nas respostas de estresse em cães.

Assim este trabalho pretende contribuir para o desenvolvimento de estudos sobre os efeitos da acupuntura e sua aplicação clínica no tratamento de distúrbios psicoemocionais e comportamentais relacionados ao estresse.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

- Estudar os efeitos da acupuntura nas respostas autonômicas e comportamentais de cães saudáveis submetidos a um modelo de estresse sonoro agudo.

1.2.2. Específicos

- Verificar o efeito de um protocolo clínico de acupuntura (pontos: VG20, *Yintang*, Pc6, C7, E36) na regulação autonômica, a partir da análise espectral da Variabilidade da Frequência Cardíaca de cães Beagles saudáveis submetidos a um modelo de estresse sonoro agudo.
- Verificar o efeito de um protocolo clínico de acupuntura (pontos: VG20, *Yintang*, Pc6, C7, E36) nas repostas comportamentais de cães Beagles saudáveis submetidos a um modelo de estresse sonoro agudo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Conceito de Estresse

A vida existe devido à manutenção do equilíbrio homeostático, constantemente ameaçado e desafiado por forças intrínsecas e extrínsecas ao organismo. O conceito de meio interno foi definido pela primeira vez pelo fisiologista francês Claude Bernard, e constitui a chave para o entendimento dos aspectos negativos do estresse. Nessa concepção, ele descreveu os princípios do equilíbrio dinâmico do meio interno como sendo essencial para a sobrevivência das células do organismo (FRANCI, 2005).

O neurologista Cannon criou o termo homeostase para definir a condição de equilíbrio do meio interno, descrita por Bernard. Cannon, também foi o primeiro a reconhecer que os agentes geradores de estresse poderiam ser tanto físicos como emocionais. Ele elaborou o conceito de “reação de emergência” que consiste na resposta de luta ou fuga (*fight or flight*) que humanos e várias espécies de animais, demonstram quando submetidos a um desafio de magnitude suficiente para ativar a liberação de adrenalina da medula da adrenal e de noradrenalina de terminais nervosos simpáticos (PACÁK & PALKOVITS, 2001; FRANCI, 2005).

Posteriormente, Hans Selye (1936) adicionou a glândula hipófise como parte do sistema de resposta do organismo ao estresse. Ele descreveu o controle exercido pela hipófise na liberação de hormônios do córtex da adrenal, importantes na resposta fisiológica ao estresse.

Em seus estudos, Selye observou que ratos apresentavam respostas físicas e psicológicas típicas e constantes quando submetidos a situações adversas. Ele designou essas respostas como “síndrome geral de adaptação”. Ele ainda observou que em ratos submetidos ao estresse constante ocorria aumento do tamanho da adrenal, atrofia do timo e de outros tecidos linfóides (FRANCI, 2005).

O termo estresse, não foi utilizado por Selye em seus primeiros trabalhos, porém ele o utilizou posteriormente e o definiu como sendo “a situação gerada pelo desafio ao qual um organismo estaria submetido”. Ocorreram controvérsias conceituais, uma vez que não se podia distinguir a causa do efeito. Então Selye criou um neologismo, o termo estressor, para

designar o agente causador (estímulo), e manteve o termo estresse, para designar a condição gerada pelo estímulo desafiador (FRANCI, 2005).

2.2 Agentes Estressores

Os estímulos estressores podem ser definidos como aqueles que desafiam a homeostase. Esses estímulos geram respostas que variam de acordo com a duração e intensidade dos estímulos e com a genética e experiências prévias do indivíduo.

Os estímulos causadores de estresse podem ser classificados em quatro grupos: estressores físicos e químicos (calor, frio, barulho, radiação intensa e substâncias tóxicas); psicológicos (medo e frustração); sociais (um ambiente hostil e rompimento de relações); e os que alteram a homeostase vegetativa como em casos de exercício intenso e hemorragias. Quanto à duração, os estímulos causadores de estresse podem ser:

- agudos - quando ocorrem em um episódio ou são intermitentes, porém a exposição, em ambos os casos, é por um período limitado;
- crônicos - quando ocorre exposição intermitente ou contínua, porém prolongada. (PACÁK & PALKOVITS, 2001).

2.3 Homeostase e Alostase

Quando o equilíbrio homeostático é desafiado, o organismo reage por meio da ativação e desativação de diversos mecanismos. Esse grupo de reações pode ser chamado de mecanismos homeostáticos. Sendo assim, quando o organismo reage a um estímulo estressor, ele pode eliminar o agente estressor através dos mecanismos homeostáticos ou manter a homeostase na presença do estímulo nocivo. A condição de homeostase mantida na presença do estressor recebe o nome de alostase e representa uma sobrecarga para o organismo devido ao maior gasto e redistribuição de energia (MC EWEN, 2000).

Os mecanismos alostáticos podem manter a homeostase na presença do agente estressor, porém eles podem ser desmobilizados inadequadamente após reequilibrar o organismo, o que também resulta em rompimento da homeostase. Desse modo, tanto a mobilização como a desmobilização inadequada dos mecanismos alostáticos provocam falhas de adaptação. Existem várias doenças relacionadas a essas falhas de adaptação, como desenvolvimento de síndrome metabólica, hipertensão, obesidade, diabetes, acidente vascular

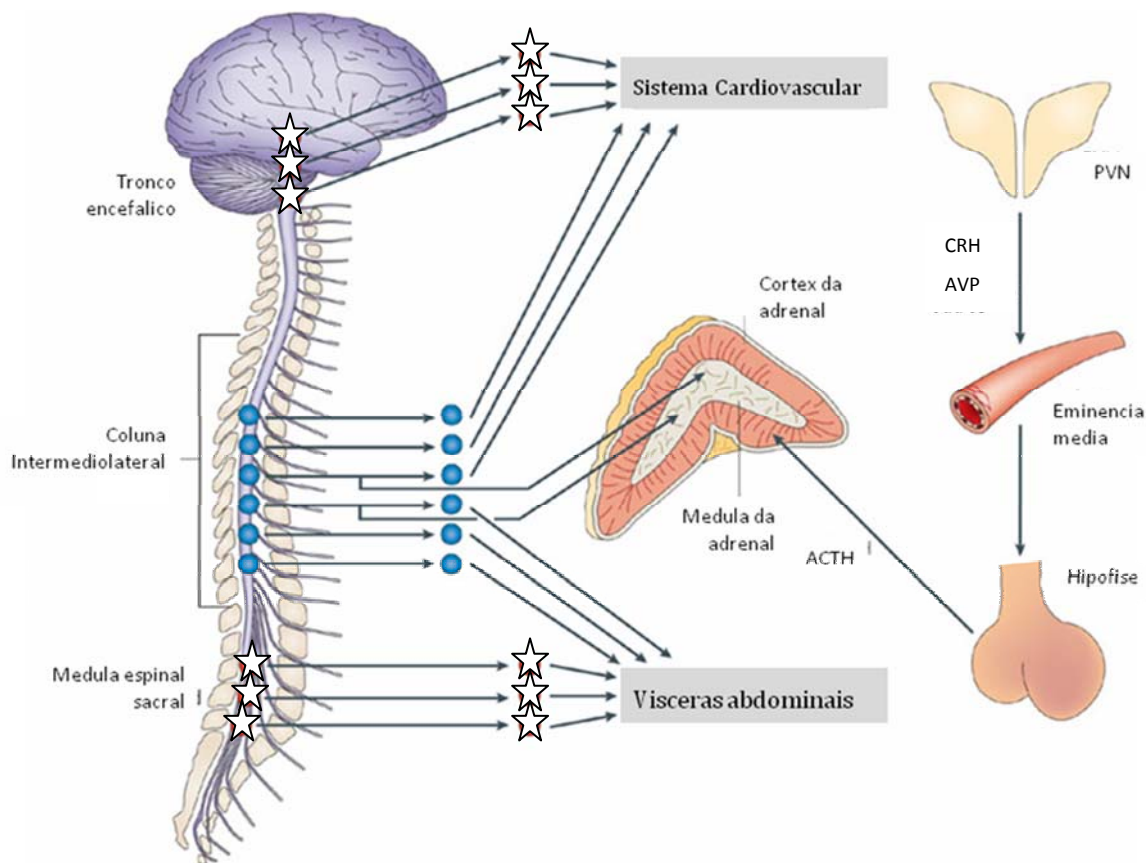
cerebral, doenças auto-imunes, distúrbios inflamatórios e úlceras gástricas, entre outros. Assim a alostase é resultante da ação bem sucedida dos sistemas de estresse (FRANCI, 2005).

2.4 O sistema de Estresse

Sistema de estresse é o nome dado ao conjunto de componentes do organismo mobilizados em situações de homeostase desafiada induzidas por diferentes estímulos estressores. Esses componentes são: o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA); o sistema nervoso autônomo (SNA) (estruturas centrais, inervação periférica e medula adrenal); sistemas aminérgicos centrais; sistema límbico cortical e subcortical e sistema imune (PACÁK & PALKOVITS, 2001).

A informação relacionada ao evento estressor, proveniente de sistemas sensoriais principais, é enviada ao encéfalo que recruta sistemas neurais e neuroendócrinos (efetores) para minimizar o evento estressor para o animal. As respostas fisiológicas ao estresse envolvem uma associação de sistemas altamente eficientes e integrados e tem como objetivo a manutenção da integridade fisiológica, mesmo nas circunstâncias de demanda (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009; MARQUES et al., 2010). 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-hipófise-adrenal (HHA), que leva a um aumento na produção de cortisol, e conseqüente mobilização de energia (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009) (figura 1).

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).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 1: Ativação do Sistema simpato-adrenomedular (SAM) e do eixo do Hipotálamo Hipófise Adrenal (HHA) como sistemas primários para a manutenção e restabelecimento da homeostase.

A exposição ao estressor resulta em ativação de neurônios pré-ganglionares simpáticos na coluna intermediolateral da medula espinal toracolombar (T1 a L2). Estes neurônios pré-ganglionares se projetam para gânglios pré e para vertebrais que então terminam em órgãos alvo e nas células cromafins da medula da adrenal. Esta ativação simpática (em círculos) representa a resposta clássica de luta e fuga, que foi primariamente caracterizada por Walter Cannon e colaboradores 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. No sistema parassimpático (em estrelas), representa a ativação de núcleos pré-ganglionares crânio-sacrais ativam núcleos pós-ganglionares localizados próximos aos órgãos inervados, com efeito geralmente oposto ao sistema simpático. Para o eixo HHA, 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. 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 glicocorticóides. Então a ativação do sistema simpático e do eixo HHA 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 HHA e do SNA. Algumas estruturas límbicas como o hipocampo e o córtex pré-frontal possuem atividade modulatória sobre o eixo HHA, enquanto que diferentes núcleos da amígdala excitam tanto o eixo HHA 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 hipocámpais pode resultar em uma resposta de estresse exacerbada (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009).

2.5 O Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA)

O Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) é sintetizado por células especializadas da hipófise anterior e liberado por ação coordenada de dois neuropeptídeos, o CRH e a vasopressina (AVP), que são sintetizados por neurônios especializados do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e liberados nos capilares da eminência média que alcançam diretamente a hipófise anterior, via circulação portal hipotalâmica-hipofisária. O PVN recebe numerosos estímulos que trazem sinais metabólicos e monitora a composição plasmática e sinais relacionados com o estado emocional. Estas multiplicidades de sinais convergem para o PVN, assim explicando a sensibilidade do eixo HHA a uma larga escala de estímulos de origem interna e externa (MORMÈDE et al., 2006).

O ACTH, por sua vez, vai para a corrente sanguínea e estimula a glândula adrenal a secretar glicocorticóides. O glicocorticóide ativo do eixo é o cortisol (cães, gatos e humanos) ou a corticosterona (pássaros e roedores). Estes são esteróides derivados do colesterol sintetizados na zona fasciculata do córtex da adrenal (MORMÈDE et al., 2006).

O cortisol exerce retroalimentação negativa no eixo HHA, através da sua ação sobre a hipófise e PVN. Este efeito de retroalimentação que o cortisol exerce contribui para o retorno dos níveis basais de cortisol após uma liberação exagerada deste hormônio pela adrenal (MANTEUFFEL, 2002).

O eixo HHA apresenta uma secreção basal de hormônios com uma oscilação ao longo do dia. No caso dos cães, que são animais diurnos, próximo ao despertar ocorrem níveis mais

altos de glicocorticóides pela manhã e níveis mais baixos à noite. Essa oscilação é regulada pelos períodos de maior atividade e menor atividade em cada espécie e não pelo grau de luminosidade (MOORE, 1999).

Um dos papéis principais das respostas hormonais às situações de estresse é proteger o organismo de possíveis danos posteriores. A secreção de adrenalina e hormônios adrenocorticais são os principais hormônios de resposta ao estresse, sendo que a secreção de epinefrina é rápida e está envolvida na reação de luta ou fuga. O papel dos corticosteroides está na segunda linha de defesa, ajudando na restauração e na reparação dos sistemas. As respostas, inflamatória e imune, são exemplos de reação rápida aos insultos ao organismo e os glicocorticóides contêm e regulam essas ações (MC EWEN, 2000; 2007).

Porém, quando ocorre a hiperativação do eixo HHA, devido a um estímulo nocivo, ocorre a hipersecreção de glicocorticóides e imunossupressão que estão entre as principais alterações decorrentes do estresse. Os glicocorticóides causam inibição do sistema imune e, este por sua vez, produz citocinas estimuladoras do CRH. Assim, ocorre um sistema de retroalimentação entre os componentes neuroendócrinos e o sistema imune. Em condições de homeostase, um componente regula a atividade do outro. A predominância do componente neuroendócrino provoca imunossupressão, enquanto a do componente imune provoca doenças auto-imunes (CHROUSOS et al., 1988).

O hormônio final do eixo HHA, o cortisol, interage com as células através da ligação a dois receptores: o receptor glicocorticóide (GR) e o receptor de mineralocorticóide (MR). O receptor GR é encontrado na maioria dos tecidos do corpo, incluindo a maioria das áreas do cérebro. No rim e em outros tecidos a aldosterona liga-se ao MR durante a regulação da reabsorção de sódio, mas o MR também está presente no hipocampo, onde ocorre a ligação do 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 provoca alterações fisiológicas em resposta ao estresse.

O cortisol tem 10 vezes mais afinidade ao MR que ao GR. Em níveis baixos ou em 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. Com a elevação dos níveis de cortisol, ocorre um aumento de ligações nos receptores GR, 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 et al., 1999).

As respostas adaptativas ao estresse envolvem ajustes funcionais e comportamentais essenciais para recuperar o equilíbrio homeostático. Os ajustes funcionais envolvem mobilização de reservas energéticas, redirecionamento e priorização da utilização de energia, além de inibição ou estímulo de atividades de sistemas do organismo. O suprimento maior de energia para órgãos priorizados é regulado, principalmente, pela liberação de catecolaminas e glicocorticóides, que promovem o aumento da neoglicogênese e da glicogenólise, inibição da captação de glicose, ativação da proteólise e lipólise. Paralelamente, ocorre inibição das funções digestivas, reprodutoras, imunes e de crescimento (CHROUSOS et al., 1988)

Em alguns casos, ocorrem mudanças irreversíveis como danos neurais em resultado de estresse crônico severo. Em outros casos o estresse exacerba os sintomas de diversas doenças pré-existentes como arteroesclerose, diabetes, distúrbios gastrointestinais e asma, assim como diminui a resistência a infecções virais e facilitam metástases de tumores. A constituição genética tem papel importante na vulnerabilidade ao impacto de forças externas potencialmente promotoras de doenças (MC EWEN, 2000).

2.6. Regulação, Interpretação e Significância da Variabilidade da Frequência Cardíaca Durante o Estresse

2.6.1 Regulação autonômica da atividade cardíaca

O Nodo Sinus (NS) é responsável pelo início dos batimentos cardíacos (STAUSS, 2003). O NS possui a maior frequência de disparo no coração e estimula outros loci cardíacos, como é o caso dos nodos atrioventriculares que, por sua vez, iniciam seus próprios impulsos elétricos. Quando não ocorre nenhuma influência neural ou hormonal, a frequência cardíaca (FC) permanece constante e equivale à frequência de disparos promovida pelo NS (STRAUSS, 2007). Em condições de repouso, tanto o Sistema Nervoso Simpático (SNS) como o Parassimpático (SNP) estão ativados e regulam a atividade cardíaca, porém com a predominância da regulação vagal. Em humanos a ativação vagal gera respostas rápidas na FC onde o NS responde ao estímulo em no máximo cinco segundos, diminuindo a FC em um a dois batimentos. No caso da ativação simpática, a resposta ocorre de modo mais lento, iniciando-se após cinco segundos do início do estímulo e aumenta progressivamente atingindo a resposta máxima após 20 a 30 segundos, aumentando a FC (HAINSWORTH, 1995). Ainda assim, os dois ramos do SNA possuem a habilidade de atuar de forma simultânea ou

independente um do outro, na regulação da atividade cardíaca. Desse modo, o aumento da atividade vagal não resulta instantaneamente na redução da simpática e vice-versa (VON BORELL et al., 2007).

Sendo assim, o SNA, dentre outros fatores (constituição física, idade, influências hormonais), influencia a flutuação da FC. As fibras nervosas simpáticas são responsáveis pela descarga de noradrenalina (NA) nos átrios e ventrículos, quando o SNS é ativado. A NA e a adrenalina (liberada pela medula adrenal), estimulam os receptores $\beta 1$ adrenérgicos do coração que por intermédio de proteínas G excitatórias (Gs) ativam a enzima adenilato ciclase (AC) a produzir AMPc. O aumento da concentração intracelular de AMPc leva à ativação da PKA (proteína quinase dependente de AMPc) que aumenta as correntes de canais iônicos (Ca^{+2} e Na^{+}), acelerando a velocidade de despolarização que resulta em aumento da frequência de disparo de potenciais de ação das células do NA, levando ao aumento da frequência cardíaca. Enquanto isso, as fibras nervosas parassimpáticas dos nervos vagos inervam o NS e o NA (nodo Átrio-ventricular) e também o miocárdio atrial. A estimulação vagal libera acetilcolina (ACh) ativando receptores M2 que estão acoplados a uma proteína G inibitória (Gi) que inibe a síntese de AMPc. A diminuição de AMPc intracelular reduz a atividade da PKA. Além disso, a ACh ativa uma corrente de efluxo de K^{+} que gera uma hiperpolarização da membrana levando ao aumento do limiar de ativação do potencial de ação sinusal. Esses efeitos reduzem a frequência de disparo de potenciais de ação das células sinusais reduzindo a frequência cardíaca (figura 2) (NASCIMENTO, 2009).

As diferenças observadas em relação ao tempo de resposta da ativação simpática e parassimpática devem-se em parte, a liberação lenta de noradrenalina pelos terminais nervosos simpáticos. Também ocorrem diferenças anatômicas entre os ramos do Sistema Nervoso Autônomo, como é o caso dos corpos celulares pré-ganglionares (CCP) do SNP que estão localizados dentro do coração, enquanto os CCP da inervação simpática estão localizados comparativamente isolados, no gânglio paravertebral. Além disso, as fibras pré-ganglionares vagais são mielinizadas, contribuindo para uma transmissão elétrica mais rápida, comparando-se com as fibras do SNS que são desmielinizadas (VON BORELL et al., 2007).

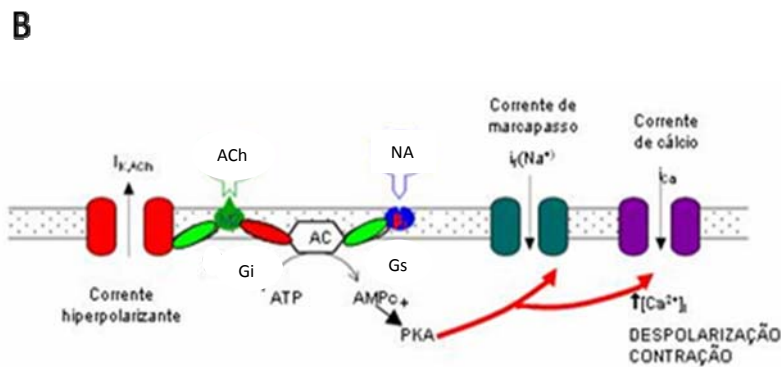
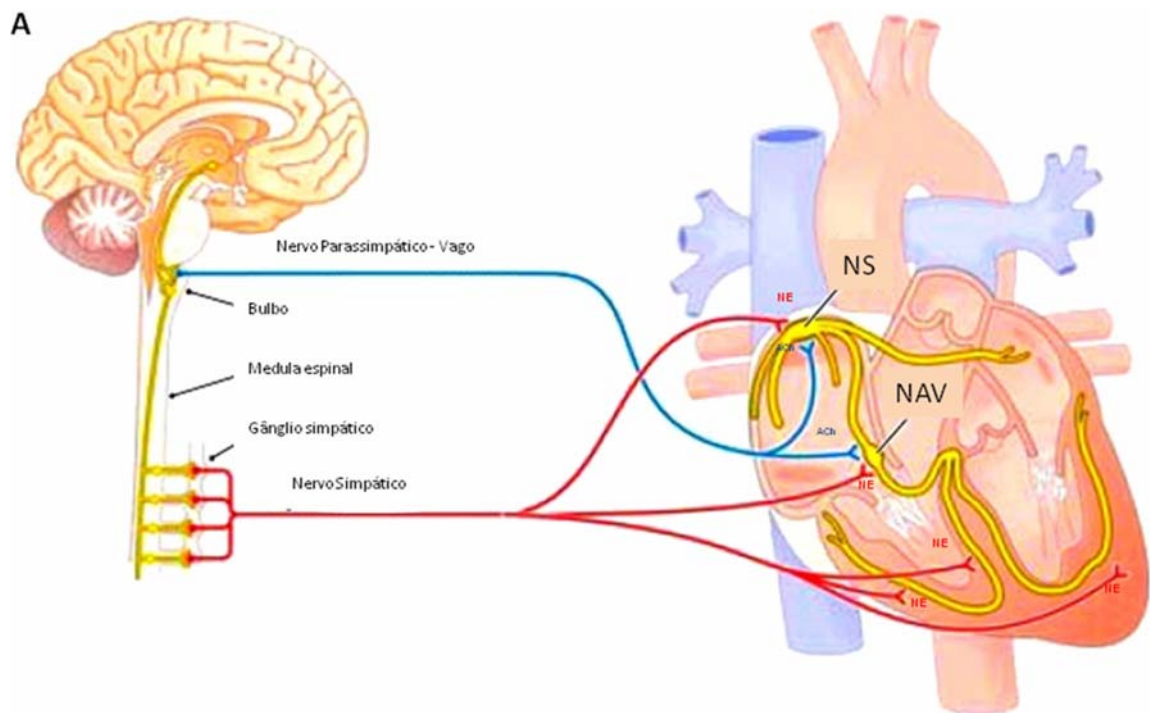


Figura 2: Efeito do sistema nervoso autônomo sobre a atividade cardíaca. Em A, inervação autonômica do coração e locais de atuação da noradrenalina (NA) e da acetilcolina (ACh) no coração. NS (nodo sinoatrial) e NAV (nodo Átrio-ventricular). Em B mecanismos intracelulares envolvidos com a estimulação simpática e parassimpática no coração. As fibras nervosas simpáticas são responsáveis pela descarga de NA nos átrios e ventrículos. NA estimula receptores β_1 adrenérgicos do coração que por intermédio de proteínas G excitatórias (Gs) ativam a enzima adenilato ciclase (AC) a produzir AMPc. O aumento da concentração intracelular de AMPc leva à ativação da PKA (proteína quinase dependente de AMPc) que aumentam as correntes de canais iônicos (Ca^{+2} e Na^{+}). As fibras nervosas parassimpáticas inervam o NS (nodo sinoatrial) e o NAV (nodo Átrio-ventricular) e também o miocárdio atrial. A estimulação vagal libera acetilcolina (ACh) que ativa receptores M2 que estão acoplados a uma proteína G inibitória (Gi) que inibe a síntese de AMPc. A diminuição de AMPc intracelular reduz a atividade da PKA. Além disso, a ACh ativa uma corrente de efluxo de K^{+} que gera uma hiperpolarização da membrana (NASCIMENTO, 2009).

2.6.2 A Variabilidade da Frequência Cardíaca

A VFC foi documentada pela primeira vez no século XVIII por Hales que descreveu a mensuração quantitativa da pressão arterial. Esse estudo demonstrou a relação entre dois batimentos cardíacos consecutivos. Desde então, a análise da VFC tem sido incorporada em diversas pesquisas relativas a condições fisiológicas, patológicas e psicológicas e tem sido utilizada, com sucesso, no diagnóstico de doenças cardiovasculares e disfunções autonômicas em humanos e animais. O uso da VFC na Medicina Veterinária permanece ainda em fase inicial em comparação com os estudos realizados em humanos. Ainda assim o seu uso vem se mostrando um importante indicador de estresse e bem-estar na pesquisa veterinária (VON BORELL et al., 2007).

A função cardíaca em indivíduos saudáveis é caracterizada por intervalos de tempo irregulares entre os batimentos cardíacos consecutivos. 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). A VFC primariamente, resulta da atividade dos ramos individuais do Sistema Nervoso Autônomo, que recebe influências neuronais e humorais além de outros controles fisiológicos e mecanismos de feedback (MALLIANI et al., 1997). 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 (VON BORELL et al., 2007).

Sendo assim, o estímulo elétrico produzido no NS recebe influência de diversos fatores que vão resultar na variabilidade de pulsos cardíacos em diferentes frequências (figura 3). De acordo com a Sociedade Européia de Cardiologia e com a Sociedade Norte Americana de Eletrofisiologia Cardíaca, essas frequências são classificadas em: ultra-baixas, que seriam resultantes do ritmo circadiano; muito baixas, que supostamente são resultantes da regulação da temperatura e dos sistemas endócrinos; baixas, que resultam de mudanças na atividade simpática (presumivelmente possuem também, alguma influência parassimpática) e altas que estão sincronizadas com o ritmo respiratório e são resultantes primariamente da atividade parassimpática (STAUSS, 2003; SONG et al., 2006; STAUSS, 2007).

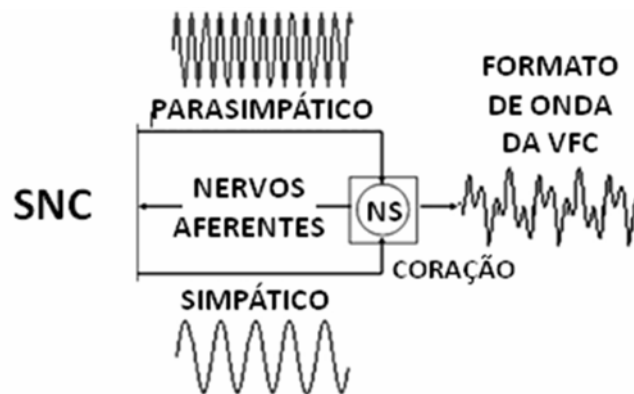


Figura 3: Modelo simplificado da formação da VFC. Sistema Nervoso Central (SNC); Nodo Sinusal (NS) (VON BORELL, 2007).

A análise da VFC permite uma determinação apurada e detalhada das características regulatórias funcionais do SNA. A VFC possui a vantagem de ser um método não invasivo e vem se mostrando, particularmente, um bom indicador da atividade do SNA em resposta ao estresse psicológico e fisiológico (PAGANI et al., 1986; SONG et al., 2006). Estados psicológicos podem levar a um impacto no balanço simpático-vagal, na ausência de qualquer alteração palpável na frequência respiratória e cardíaca. (VON BORELL et al., 2007). A maioria dos estudos realizados com a VFC em relação a estados emocionais tem sido feito em humanos, porém há evidências de que os mesmos princípios podem ser aplicados aos animais uma vez que o sistema límbico humano, considerado responsável pelas emoções, é semelhante ao encontrado em outras espécies de mamíferos. A estimulação elétrica do hipotálamo e do sistema límbico em modelos animais gera as mesmas respostas emocionais que as observadas em humanos. Além disso, o controle funcional do tônus vagal é semelhante em todos os mamíferos (VON BORELL et al., 2007).

Segundo Porges (2003), homeostase pode ser definida como um estado autonômico caracterizado pelo incremento da atividade vagal. Sendo assim, é possível quantificar as respostas ao estresse nesse nível fisiológico, a partir da mensuração das alterações do tônus vagal e da atividade simpática. Além disso, estados autonômicos basais estão correlacionados com a suscetibilidade de cada indivíduo a agentes causadores de estresse. Indivíduos com tônus vagal naturalmente baixos são potencialmente mais vulneráveis ao estresse. Por outro lado, aqueles que apresentam tônus vagal elevado possuem uma atividade regulatória

autônoma eficiente, o que permite ao organismo uma resposta mais adequada a estímulos desafiadores da homeostase (VON BORELL et al., 2007).

2.6.3 A análise espectral da Variabilidade da Frequência Cardíaca

A análise dos domínios de frequência da VFC é utilizada para mensurar as principais flutuações rítmicas que caracterizam, inclusive em estado de repouso, a série cronológica dos intervalos cardíacos RR (IRR). Dessa forma pode-se mensurar a atividade do SNA (SONG et al., 2006; MARQUES et al., 2010). Os dados são obtidos através da gravação dos intervalos entre batimentos cardíacos, feitos por frequencímetros capazes de detectar em milisegundos (ms) o tempo entre os batimentos e armazená-los (LOMBARDI, 1997; VON BORELL et al., 2007).

A técnica utilizada com esse objetivo é chamada de análise espectral e consiste no uso de algoritmos matemáticos, como é o caso da Transformada Rápida de Fourier (FFT), para obter diagramas dimensionais. Em um gráfico são dispostos os componentes oscilatórios de frequência da VFC no eixo X e a amplitude dos componentes oscilatórios no eixo Y. Utilizando-se essa técnica, é possível determinar a força espectral (uma medida para a amplitude) das frequências baixas e altas da VFC.

Sendo assim, a VFC contém dois componentes de frequência principais que são divididos através da análise espectral: a frequência baixa (LF) que é o componente caracterizado pelo espectro de 0,04 a 0,15Hz e a alta (HF) que está situada na faixa de 0,15 a 0,4 Hz na análise espectral (KAWASE et al., 2002; VON BORELL et al., 2007; PICCIRILLO et al., 2009).

Adicionalmente, um gráfico é confeccionado quando os IRR são dispostos em uma escala de tempo. As oscilações formadas no gráfico são o resultado da ação dos diferentes componentes regulatórios dos pulsos cardíacos, onde a atividade rítmica resultante da ativação parassimpática exhibe frequências mais altas que aquelas resultantes da atividade simpática (LOMBARDI, 1997; VON BORELL et al., 2007) (Figura 4).

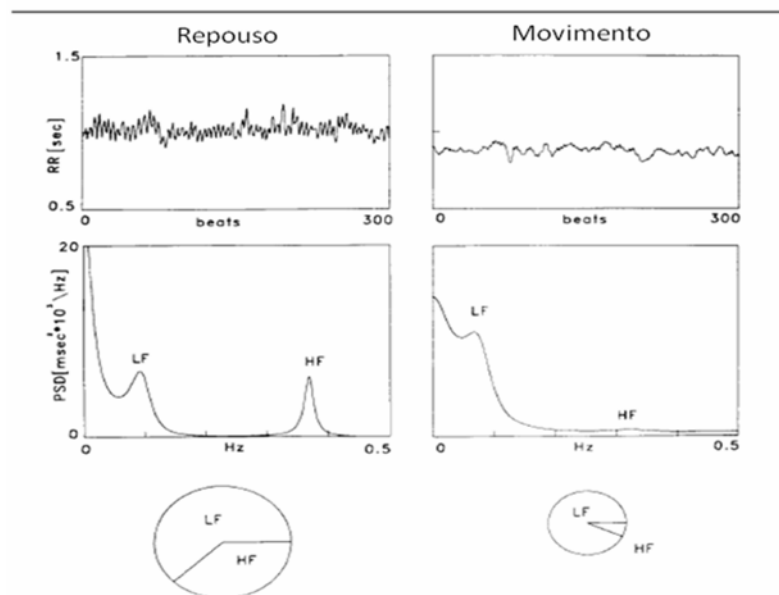


Figura 4: Análise espectral da VFC em um indivíduo jovem durante o repouso e quando em movimento. A série temporal de intervalos RR está disposta nos gráficos do topo. Os gráficos centrais ilustram a presença de dois componentes principais da densidade espectral: LF e HF. Durante o movimento o componente LF se torna predominante em relação ao repouso. Os gráficos na base da figura demonstram a distribuição relativa dos dois componentes (representada pela área) (MALLIANI, 1997).

Os valores dos componentes frequenciais variam entre as espécies e os valores citados são utilizados em humanos e vem sendo utilizados também em estudos em cães. A partir dos valores obtidos de LF e HF, calcula-se a razão entre os dois componentes de frequência e assim, pode-se acessar o balanço entre a atividade simpática e parassimpática (PAGANI et al., 1986; LOMBARDI et al., 1996; MALLIANI et al., 1997; VON BORELL et al., 2007; HARADA et al., 2005).

Desse modo, a análise possui a vantagem de possibilitar a decomposição dos componentes espectrais realizando o cálculo das frequências centrais desses componentes que se situam implícitos no sinal da variabilidade (LOMBARDI, 1997).

Na atualidade verificou-se que a análise espectral da VFC é capaz de acessar o balanço autonômico cardíaco, e não o tônus autonômico cardíaco. Sendo assim quando há alterações crônicas na atividade autonômica, pode ocorrer uma alteração na capacidade do coração de responder a esses estímulos, nesses casos a análise espectral da VFC não seria aplicável (STAUSS, 2007; PICCIRILLO et al., 2009).

A utilidade da análise espectral da VFC como indicador da atividade simpática em resposta ao estresse físico e psicológico vem sendo demonstrada em diversos estudos (VON

BORELL et al., 2007). Porém, deve-se ressaltar que essa análise é utilizada de maneira a obter dados fidedignos quando é aplicada no estudo das alterações agudas da atividade autonômica cardíaca. Um aumento agudo na atividade cardíaca simpática, como ocorre em resposta ao estresse psicológico, é caracterizado pelo aumento do componente LF e provavelmente não vai alterar o componente HF (STAUSS, 2007).

2.7. Alterações Decorrentes do Estresse em Cães

Apesar das respostas ao 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 HHA, 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 HHA (AKANA et al., 1992). O resultado final é a hipersecreção basal de glicocorticóides, hipertrofia adrenal e / ou atrofia do timo (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009), um aumento no tônus central do eixo HPA, baixa regulação dos receptores de glicocorticóides (GR) em regiões-chave de “feedback” do eixo HPA (HERMAN et al., 1995) e, ainda a facilitação de respostas de corticosteróide a estressores novos (AKANA et al., 1992) além da redução da eficácia do “feedback” negativo dos glicocorticóides (MIZOGUCHI et al., 2003), depressão e alterações comportamentais (WILLNER, 2005). Todas estas seqüelas podem ser associadas a mudanças nas vias centrais responsáveis pela regulação do eixo HPA, destacando-se, as vias que medeiam as respostas antecipatórias ao estresse, como a amígdala (hipertrofia dentrítica) e o hipocampo (atrofia dentrítica e redução da sensibilidade ao GR) (JANKORD & HERMAN, 2008).

Além do aumento da sensibilidade ao estresse subsequente, a exposição crônica ao estresse tem sido associada a várias condições. Na tabela 1 estão correlacionadas as respostas de estresse com os distúrbios relativos às respostas ao estresse.

Tabela 1: relação das respostas de estresse e os respectivos distúrbios relacionados.

Respostas ao estresse	Desordens relacionadas às respostas ao estresse
Mobilização de energia	Miopatia, fadiga, diabetes
Aumento do tônus cardiovascular	Hipertensão induzida por estresse
Supressão da digestão	Úlcera gástrica
Supressão do crescimento	Distúrbios de adaptação social
Supressão da reprodução	Amenorréia, impotência, diminuição da libido
Supressão do sistema imune	Incremento de risco de doenças
Modelagem da cognição	Morte celular

(SAPOLSKY, 1992)

O aumento do nível plasmático de cortisol é capaz de diminuir a imunocompetência do organismo e, conseqüentemente pode levar à maior suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças. Sendo assim, os parâmetros imunológicos servem como indicadores de saúde tanto para humanos como para animais. No caso dos cães, foi demonstrado que as situações de estresse agudo geram alterações nos valores hematológicos, levando a um quadro de leucocitose generalizada, neutrofilia, linfopenia e eosinopenia (BEERDA et al., 1999).

O SNS ainda estimula o baço a liberar eritrócitos armazenados, o que aumenta os níveis de hematócrito. No caso dos cães os valores elevados de hematócrito são bem pronunciados. Adicionalmente, a ativação do SNS normalmente aumenta os níveis de pressão sanguínea e da frequência cardíaca (SANDBERG et al., 2004).

Foi demonstrada a ocorrência de aumento dos níveis de cortisol em cães quando estes foram submetidos a procedimentos de transporte (BERGERON et al., 2002), ou expostos a sons altos como fogos de artifício, trovões e tiros de armas de fogo (BEERDA et al., 1998), bem como quando ficam em espaços restritos ou privados de socialização (BEERDA et al., 1999). Sendo assim as concentrações de cortisol plasmático constituem o indicador mais forte de estresse no caso dos cães (HAVERBEKE et al., 2008).

Além disso, os níveis de cortisol podem ser associados a comportamentos sociais. Quando um indivíduo perde uma competição, por exemplo, ocorre um aumento da secreção de cortisol, e esse aumento pode impedir o indivíduo de competir novamente (JONES, 2006).

Os desvios na homeostase causados pelo estresse podem resultar em desordens psiquiátricas ou psicossomáticas. Em cães, as alterações comportamentais mais observadas em resposta a um estímulo estressor agudo são: as reações de fuga (fugir do local, correr em

disparada), as reações de medo (se esconder, sobressaltar-se), as reações destrutivas e de agressividade (KING et al., 2003; MILLS et al., 2003).

Entretanto, o comportamento individual é geralmente, influenciado pela raça, sexo e experiências passadas assim como, pela sua condição de bem-estar atual. (HIBY et al., 2006)

Apesar de não haver uma concordância universal sobre as definições e quantificações de bem-estar, uma das definições mais reconhecidas é a de Broom (citado por HAVERBEKE et al., 2008): “bem-estar de um indivíduo é o seu estado em relação às suas tentativas em adaptar-se ao ambiente que o rodeia em níveis fisiológicos, comportamentais e de saúde” Essa definição vem sendo chamada também de “visão homeostática”.

Vários parâmetros fisiológicos têm sido utilizados como indicadores de bem-estar em cães, incluindo os níveis de catecolaminas, a função imune e a frequência cardíaca. Porém, as pesquisas mais recentes em cães têm sido direcionadas para as variações dos níveis de cortisol em resposta a um estímulo estressor (BEERDA et al., 1998).

Desse modo, para que se possa realizar um estudo em cães submetidos a um modelo de estresse, é importante analisar as respostas neuro-endócrinas e comportamentais dos animais. Em cães tal metodologia vem sendo utilizada em estudos relacionados ao medo e ao estresse em indivíduos submetidos a estímulos desafiadores, como no caso de sons de trovões (BEERDA et al., 1997; SANDBERG et al., 2004).

2.8 O Estresse Sonoro em Cães

O aparelho auditivo foi desenvolvido para ser um órgão de percepção, principalmente para reconhecer situações de perigo para o indivíduo. Os sons do ambiente provocam emoções e ações através da conexão direta do ouvido interno com os mecanismos neurais de “luta ou fuga”. Devido a sua característica de defesa, a audição não pode ser interrompida e os sons são registrados no cérebro mesmo durante o sono.

O sistema de audição é capaz de processar frequências e intensidades de som relevantes para a sobrevivência do indivíduo em seu meio ambiente. (WESTMAN & WALTERS, 1981).

O som contribui para a homeostase do sistema nervoso central (SNC) e, conseqüentemente influencia o equilíbrio fisiológico do organismo através dos centros autonômicos e neuroendócrinos do hipotálamo. O nível de estímulo do SNC depende da intensidade, complexidade, variabilidade, previsibilidade e significado do estímulo sonoro.

Há três tipos de respostas fundamentais ao estímulo sonoro:

- **resposta de orientação** (reflexo de novidade) – é a resposta comportamental básica a todos os estímulos sonoros. A resposta consiste na orientação da cabeça e dos olhos em direção à fonte sonora. Isso ocorre para preparar o organismo para responder à situação. Esse reflexo ocorre em resposta a sons de baixa a moderada intensidade e significância. O reflexo deixa de ocorrer após várias repetições do mesmo som, sendo assim o indivíduo pode se habituar a sons familiares e sem significado. Mas, se um período de tempo considerável passa entre as repetições de um estímulo sonoro específico, o indivíduo volta a apresentar a resposta de orientação. A habituação a determinado som normalmente não ocorre quando o indivíduo mantém voluntariamente sua atenção voltada para o estímulo, ou quando esse som possui um significado, seja ele positivo ou negativo. Sons que possuem sua intensidade próxima ao limiar de audição do indivíduo, são de difícil habituação, provavelmente devido à dificuldade do sistema auditivo de avaliar seu significado;
- **reflexo de surpresa** – ocorrem em resposta a sons repentinos, intensos ou de caráter assustador. Esse reflexo pode ser atenuado quando o estímulo pode ser antecipado pelo indivíduo ou pode se tornar exagerado quando o indivíduo se encontra emocionalmente abalado ou com medo;
- **resposta de defesa** – o indivíduo reage dessa forma em resposta a sons de intensidade, duração e significância suficientes para ser percebido como uma ameaça e quando provoca a reação de “luta ou fuga”. A resposta consiste em alerta do córtex cerebral, em excitação emocional, e na preparação do corpo para ação. Sons na escala de 70 a 120 dB podem estimular a resposta de defesa. É nesta resposta que consiste o estresse, e que leva a Síndrome Geral de Adaptação, podendo ocorrer as fases de alarme, resistência e exaustão se o estímulo sonoro for de duração e qualidade suficientes. Quando isso ocorre, o eixo HHA e o SNS são ativados resultando no aumento da secreção de cortisol e adrenalina (WESTMAN & WALTERS, 1981).

Assim, o significado dos estímulos sonoros está, primariamente, relacionado à sobrevivência do indivíduo. Sendo assim, o significado dos sons consiste em um dos fatores mais importantes na determinação de respostas do organismo ao ambiente em que vive. Sons

ameaçadores de qualquer natureza representam um perigo em potencial, todavia alguns sons adquirem um significado particular, devido ao que eles simbolizam para o indivíduo. Enquanto isso, sons familiares e repetitivos de intensidade moderada deixam rapidamente de atrair a atenção. Então, o significado conotativo de um som ameaçador em potencial, está relacionado ao fato de ser desconhecido, de ter mudanças rápidas de intensidade e das associações que se relacionam a ele. Além disso, o fato do estímulo sonoro ser previsível ou não, constitui um fator determinante na resposta do indivíduo. Sons imprevisíveis constituem um estímulo estressor maior quando comparados a sons previsíveis, levando à redução geral da performance do indivíduo e à baixa tolerância a frustrações (WESTMAN & WALTERS, 1981).

Deste modo, na sociedade moderna há um elevado número de estímulos sonoros potencialmente estimuladores de medo e estresse. No caso dos cães, podem ser citados os sons de fogos de artifício, tiro de armas de fogo e sons de trovões. Isso ocorre, provavelmente, devido a essa espécie não estar adaptada a esse estímulo ou por ser um estímulo de intensidade muito próximo ao seu limiar de audição e, ainda por representar um estímulo de conotação negativa para os indivíduos dessa espécie. Essas situações podem levar certos cães a níveis de estresse que afetam seu bem-estar e sua saúde (SANDBERG et al., 2004).

2.9 Acupuntura – Terapia Integrante da Medicina Tradicional Chinesa

A palavra acupuntura é derivada dos radicais latinos “acus e pungere”, que significam agulha e puncionar respectivamente. Trata-se de uma terapia que faz parte da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) e tem como técnica básica a inserção de agulhas finas de metal (aço inox) em pontos específicos da pele com propósitos terapêuticos. A teoria geral da acupuntura é baseada na premissa de que há um padrão de fluxo de energia (chamada “*Qi*”) através do corpo, essencial para uma saúde perfeita. Assim, a acupuntura é essencialmente uma técnica utilizada para corrigir disfunções fisiológicas reversíveis de diversas origens. Essa técnica vem sendo utilizada largamente como intervenção terapêutica em casos de distúrbios comportamentais e físicos decorrentes de estresse (WEN, 1989; JAGGAR, 1992; SCHOEN, 2001).

Segundo hipótese de Mann (1982), a inervação da pele recebe e envia impulsos de diferentes regiões do corpo (reflexos víscero-somáticos e somato-vísceral). Quando um órgão está em uma situação de desequilíbrio, gera-se um estímulo nos terminais nervosos sobre a

pele. Trata-se de um reflexo, que torna o local afetado da pele doloroso ao ser pressionado. Este estímulo pode ser sentido ao longo dos meridianos onde se localiza a maioria dos pontos de acupuntura. Quando uma agulha fina é inserida no ponto sensível e as fibras nervosas são estimuladas, o impulso propaga-se para o tronco encefálico e de lá retorna para o órgão afetado, ajudando a restabelecer o seu equilíbrio normal.

O mecanismo da acupuntura proposto é baseado no princípio de manter ou recuperar a homeostase. Muitos esforços têm sido feitos para estabelecer adequadamente as propriedades e características desses mecanismos em termos de neuroanatomia, neurofisiologia e neuroquímica (TIRGOVISTE, 1975; YAMAMURA, 1993).

A saúde pode ser definida como um estado de harmonia entre o corpo e o seu ambiente interno e externo. Quando existe um estado de harmonia, diz-se que o organismo se adaptou com êxito ao seu ambiente interno e externo, podendo assim manter suas funções. O ambiente externo inclui: nutrição, clima e forças geofísicas e eletromagnéticas. Fatores internos são caracterizados por influências hereditárias, sistema neuroendócrino e estado emocional. Sob este conceito a saúde não é absoluta, mas sim um estado relativo. (LIMEHOUSE & TAYLOR-LIMEHOUSE, 2006).

A doença surge quando há desequilíbrio dentro do ambiente interno ou entre os ambientes interno e externo. A doença normalmente se origina como resultado de diversas causas ocorrendo juntas e sobrecarregando o mecanismo homeostático do organismo (LIMEHOUSE & TAYLOR-LIMEHOUSE, 2006).

2.10 Acupuntura na Redução das Respostas de Estresse

Na medicina ocidental contemporânea, a acupuntura é considerada uma modalidade de estímulo sensorial que afeta diversas classes de fibras nervosas aferentes. (MANNI et al., 2009)

Os estímulos gerados pela acupuntura podem ativar os centros autonômicos e o sistema hipofisário e desse modo, ajudar na manutenção da homeostase e na melhora da eficiência dos mecanismos imunológicos do organismo (YANG et al., 2002).

Alguns experimentos investigaram os efeitos da acupuntura nas respostas ao estresse. Esses estudos mostraram evidências de que a acupuntura pode reduzir os níveis de noradrenalina em regiões do cérebro bem como na circulação sanguínea (CAO et al., 1983). Além disso, Liao (1980) demonstrou que a estimulação elétrica do ponto E36 (*Zusanli*) inibiu

a hipersecreção de corticosterona induzida pelo estresse de imobilização em coelhos. Em humanos, a acupuntura no mesmo ponto, foi capaz de reduzir significativamente as elevações na pressão arterial induzida pelo estresse (MIDDLEKAUFF et al., 2001). Em ratos, a eletroacupuntura nos pontos PC6 e C3 reduziu os níveis de adrenalina e noradrenalina, além de reduzir a frequência cardíaca e a pressão arterial de animais submetidos ao estresse de imobilização (YANG et al., 2002). Além disso, verificou-se que em ratos naturalmente hipertensos, a acupuntura levou à diminuição da pressão arterial e os animais demonstraram um comportamento mais tranquilo (YAO et al., 1982). Foi observado ainda um efeito ansiolítico em animais expostos ao estresse de confinamento quando tratados com acupuntura (GUIMARÃES et al., 1997).

Segundo Kim e colaboradores (2009), vários estudos tem demonstrado os efeitos da acupuntura na regulação da função do eixo HHA, depois de uma resposta a estímulos estressores. E ainda, foi demonstrado que pontos utilizados na acupuntura como o Pc6 (Neiguan), que está localizado no meridiano do pericárdio, têm sido utilizados com sucesso no tratamento de doenças mentais e desordens psicossomáticas. O Pc6 também é conhecido por ter um efeito tranquilizante e antiemético, sendo utilizado no tratamento de várias modalidades de estresse (YANG et al., 2002; KIM et al., 2009).

O efeito da acupuntura foi avaliado em experimentos com estresse agudo por contenção. Guimarães e colaboradores (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, a frequência cardíaca e análise de comportamento. Os resultados obtidos sugeriram 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.

Além destes efeitos moduladores das respostas de estresse, estudos recentes têm comprovado a indicação milenar do uso da acupuntura para o tratamento de alterações cognitivas. A estimulação elétrica transcutânea (TENS) é capaz de melhorar a memória de curta e longa duração, a fluência verbal, as funções físicas e afetivas de pacientes com Doença de Alzheimer (GUO et al., 2002). Em ratos, a acupuntura atenua os déficits na resposta da esquiva passiva causados pela ciclohexamida, mas não tem efeito nas alterações causadas pela escopolamina (CHANG et al., 1999). Estes efeitos da acupuntura nas funções cognitivas podem estar relacionados a alterações plásticas do SNC. A estimulação do ponto E36

(Zusanli) foi capaz de aumentar a proliferação celular no giro denteado (KIM et al., 2011), diminuir a expressão de c-Fos e a apoptose em neurônios do hipocampo (JANG et al., 2003) após isquemia causada por oclusão das carótidas. Além disso, a acupuntura também se mostrou efetiva nas alterações plásticas induzidas por estresse. A estimulação do ponto C7 aumentou a neurogênese em ratos submetidos ao estresse de separação materna (PARK et al., 2002) e a eletroacupuntura no ponto E36 (Zusanli) aumentou a expressão de fatores neurotróficos no hipocampo de ratos submetidos ao estresse de imobilização (YUN et al., 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de Execução do Trabalho Experimental

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária do Departamento de Parasitologia Animal (DPA) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e no Laboratório de Fisiologia Animal do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) da UFRRJ. Todos os procedimentos estão de acordo com a lei de bem-estar animal, Instrução Normativa nº 56 de 2008. O presente experimento encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da UFRRJ/ COMEP, nº 23083.013953/2010-41.

3.2 Animais

Foram utilizados 24 cães da raça Beagle, com 1 a 6 anos de idade, pesando 9 a 16 Kg, saudáveis e com vacinas e vermifugação em dia provenientes do Canil de Experimentação do Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária sob responsabilidade do Professor Fábio Scott do DPA do Instituto de Veterinária da UFRRJ.

3.3 Procedimentos Experimentais

O protocolo experimental foi realizado em cada animal, iniciando-se sempre às 9 horas e às 14 horas. Um pesquisador acompanhado de um pesquisador colaborador realizaram todo o protocolo experimental, sem se ausentarem em nenhuma etapa do experimento. Cada etapa do protocolo está explicada detalhadamente nos próximos itens.

Cada animal foi retirado de sua instalação e levado para a enfermaria situada ao lado dos cercados de criação, aonde foi realizado o exame clínico que consistiu na aferição da temperatura corporal, ausculta pulmonar e cardíaca, exame otológico, exame visual de mucosas e exame físico. O exame clínico foi realizado para confirmar as boas condições de saúde de cada animal no dia do experimento.

Em seguida foi realizada a colocação do frequencímetro (Polar Pro Trainer RS800CX) que é constituído por uma faixa elástica contendo dois eletrodos e um transmissor que capta os sinais adquiridos pelos eletrodos e os envia para o relógio do equipamento que armazena esses dados. Os animais permaneceram com a faixa durante todo o protocolo experimental. Após a colocação, da faixa os animais permaneceram no local por 10 minutos para ser registrado o basal 1 (no ambiente do animal) para que os animais se acostumassem à faixa. Em nenhum momento do experimento foi verificado desconforto dos animais em relação ao equipamento. Em seguida cada animal foi transportado para a sala onde foi executado o modelo de estresse sonoro agudo. O transporte teve duração média de 15 minutos e foi realizado acondicionando-se o animal em um carro de passeio em uma caixa de transporte, com ventilação adequada, própria para o seu tamanho. Após a chegada na sala de experimentação foi colocada uma coleira com guia no pescoço dos animais, a qual eles estão habituados em seu manejo. Os animais permaneceram na sala, sem manipulação e sem interação por parte dos pesquisadores, por 30 minutos para o registro a VFC basal (basal 2). A etapa de adaptação foi filmada para registrar as reações comportamentais no momento basal. Após a adaptação foi coletada a primeira amostra de sangue para detecção do nível de cortisol sérico antes do estímulo sonoro (C0).

Após a primeira coleta se seguiu o tratamento correspondente a cada grupo do experimento com duração de 20 minutos.

O estímulo sonoro foi realizado 5 minutos após o término dos tratamentos e antes de seu início, cada o animal foi posicionado a um metro das caixas de som. Para que os animais demonstrassem reações ao estímulo, cada animal permaneceu seguro por um apenas pela guia, podendo reagir e se locomover naturalmente sem intervenções. O estímulo sonoro consistiu em uma gravação de sons de trovão no formato *wave* padronizado a uma intensidade sonora máxima de 103-104 dB e teve duração de 2 minutos e 30 segundos.

Após o fim do estímulo sonoro cada animal permaneceu sem manipulação. A segunda coleta de sangue (C1) foi realizada 15 minutos após o fim do estímulo sonoro e a terceira coleta de sangue (C2) foi realizada 30 minutos após a segunda seguida de retirada do frequencímetro. O esquema do protocolo experimental está representado na figura 5.

A filmagem foi realizada durante o estímulo sonoro e 5 minutos após seu término, para registrar as reações comportamentais nos momentos estresse e pós-estresse.



gura 5: Esquema do protocolo experimental

3.4 Coleta e Manipulação das Amostras de Sangue

As coletas de sangue foram realizadas através do método de coleta com agulhas para tubos a vácuo (Vacutein®). O acesso foi realizado diretamente na veia jugular, uma vez que os cães são totalmente adaptados a essa via de coleta. As amostras de aproximadamente 3 ml foram coletadas em tubos próprios para análise bioquímica para detecção das concentrações de cortisol sérico. O soro foi separado através de uma centrifuga, por 20 minutos a 3800 rpm, e acondicionado à temperatura de -80 graus centígrados até serem analisados.

3.5 Tratamentos

Os animais foram divididos em três grupos, compostos por quatro machos e quatro fêmeas em anestro:

- CTL – grupo controle (não tratado), n = 8;
- NP – grupo tratado com agulhas em pontos não correspondentes aos utilizados na Medicina Tradicional Chinesa (não pontos), n = 8 e
- ACUP – grupo tratado com agulhas em pontos de acupuntura (acupontos), n = 8.

Os tratamentos foram realizados ao término da coleta da primeira amostra de sangue. Durante a etapa do tratamento foi realizada uma contenção suave enquanto os animais permaneceram em cima da bancada, igual para todos os grupos.

No grupo ACUP, os animais foram posicionados numa bancada e inseridas agulhas para acupuntura de aço inox (0,30x30 mm, Dong Bang®) a uma profundidade de 3 mm nos acupontos *Yintang*, VG20, E36 (bilateral), Pc6 (bilateral) e C7 (bilateral), no total de 8 agulhas (figura 6). As agulhas foram mantidas sem manipulação adicional durante vinte minutos.

Na localização de diversos pontos de acupuntura, na MTC, se utiliza uma unidade de medida relativa denominada cun. Um cun equivale, no caso dos cães, à largura da costela flutuante ou ao comprimento da primeira vértebra coccígea. (XIE & PREAST, 2007). A

seguir estão descritas as localizações (XIE & PREAST, 2007), substrato anatômico (DRAEHMPAEHL & ZOHMANN, 1997) e indicações (MACIOCIA, 1996; XIE & PREAST, 2007; FOCKS & MARZ, 2008) segundo a MTC, dos pontos de acupuntura selecionados para o tratamento do grupo ACUP com suas respectivas nomenclaturas em denominação numérica, em chinês (*pinyin*) e traduzidas para o português (DRAEHMPAEHL & ZOHMANN, 1997; FOCKS & MARZ, 2008):

Ponto Ex HN3 ou VG24 – 1 ou *Yintang* (Ponto da Maravilha):

Localização: na linha média dorsal da cabeça, entre as duas fossas temporais.

Substrato anatômico: ramo dorsal nasal da artéria infraorbitária. Ramo zigomático do nervo auriculopalpebral do nervo facial. Ramo dorsal do nervo oftálmico.

Indicações: elimina o vento interno (trata convulsões, medo); tranquiliza o *shen* (trata distúrbios psíquicos e ansiedade).

Ponto VG20 ou *Baihui* humano (Cem encontros):

Localização: na interseção da linha média dorsal da cabeça com a linha formada a partir do ápice das duas orelhas.

Substrato anatômico: ramificações finais da artéria e veia temporal superficial e ramificações da artéria e veia occipital. Ramificações do nervo occipital maior.

Indicações: tranquiliza o vento, acalma o *yang*, beneficia o cérebro e os órgãos dos sentidos, tranquiliza o *shen* (trata tontura, dores de cabeça, distúrbios psíquicos, relaxa os tendões e os músculos).

Ponto E36 ou *Zusanli* (Três milhas do pé):

Localização: está a 0,5 cun lateral à crista da tíbia, na concavidade do músculo tibial cranial.

Substrato anatômico: nervo fibular comum (profundamente), nervo cutâneo lateral da sura e ramificações da pele do nervo safeno (superficialmente). Artéria e veia tibial cranial. Fusos tendíneos e musculares do músculo tibial cranial.

Indicações: fortalece o *qi* e o *yang*, nutre o sangue e o *yin* (ponto regulador geral de energia, principal ponto utilizado em estados de fraqueza, tontura, alergias, e para imunoestimulação); regula o estômago, fortalece o baço, transforma umidade (trata distúrbios do trato gastrointestinal); tranquiliza o *shen* (trata inquietação, estado de choque, histeria).

Ponto Pc6 ou Neiguan (passagem interna):

Localização: está a três cun proximal à articulação do punho, entre os tendões dos músculos flexor digital superficial e flexor radial do carpo.

Substrato anatômico: Artéria e veia interóssea caudal, artéria e veia mediana. Nervo mediano, nervo cutâneo antebraquialmedial (do nervo músculo cutâneo) e em parte, ramo medial do nervo cutâneo antebraquial lateral (nervo radial).

Indicações: tranquiliza o *shen* (trata ansiedade, inquietação, distúrbios psíquicos, convulsão, histeria);
harmoniza o estômago (trata distúrbios gástricos).

Ponto C7 ou Shenmen (porta da mente):

Localização: na altura da articulação carpal, no orifício maior lateral.

Substrato anatômico: nervo cutâneo antebraquial medial do nervo músculo-cutâneo, ramo palmar do nervo ulnar. Na junção da artéria e veia ulnar e artéria e veia interóssea caudal.

Indicações: regula e fortalece o coração (o *yin* e o sangue), tranquiliza o *shen* (trata distúrbios psíquicos, distúrbios do sono, histeria, pavor, ansiedade, dor torácica, é ponto de sedação).

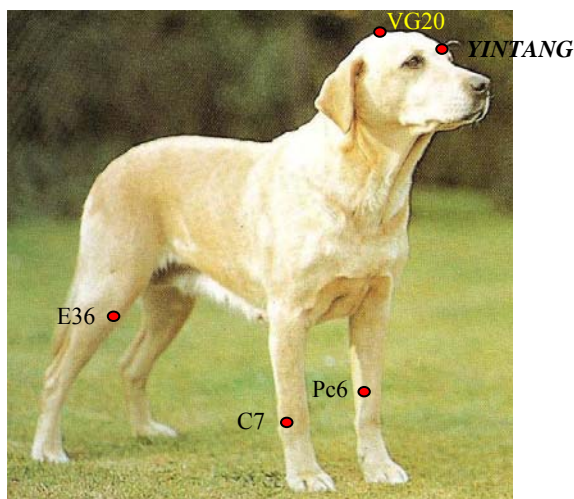


Figura 6: Localização dos pontos de acupuntura utilizados no tratamento do grupo ACUP.
Fonte: acervo pessoal.

No grupo NP, os animais também foram colocados numa bancada e agulhas de acupuntura (0,30x30 mm, Dong Bang®) foram inseridas a uma profundidade de 3 mm em locais próximos aos pontos escolhidos para o tratamento do grupo ACUP. Os locais de

inserção de agulhas no grupo NP foram escolhidos de modo a se evitar vasos calibrosos e outros pontos de acupuntura ou meridianos. A seguir estão descritas as localizações dos não pontos utilizados:

Não-Ponto do *Yintang*: 3,5 cun acima e 3,5 cun ao lado a partir do *Yintang*;

Não-Ponto do Ponto VG20: 3 cun caldal e 2cun lateral, a partir do VG20;

Não-Ponto do Ponto E36: na direção do E36, caudalmente, atrás da fíbula;

Não-Ponto do Ponto Pc6: na direção do Pc6, medialmente ao tendão do músculo flexor radial do carpo;

Não-Ponto do Ponto C7: um cun acima e um cun lateral ao C7.

No grupo CTL, os animais foram posicionados na mesma bancada e contidos de forma suave, exatamente da mesma maneira que em ACUP e NP. Os animais permaneceram em cima da bancada por 20 minutos, sem agulhas e sem manipulações adicionais.

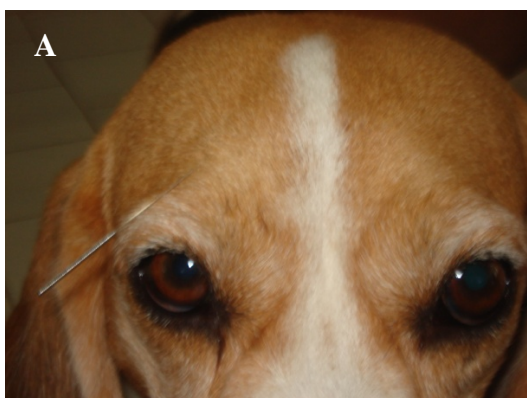


Figura 7: Fotografias ilustrando a localização dos não pontos. Em A não-Ponto do *Yintang*; em B não-Ponto do VG20; em C não-Ponto do Pc6 e não-Ponto do C7; em D não-Ponto do E36.

3.6 Estímulo Sonoro

O estímulo sonoro consiste numa gravação com duração de 2 minutos e 30 segundos de sons de trovão mixados alternadamente a partir de dois arquivos sonoros no formato wave (“*very loud thunder, close thunder crack*” e “*high quality stereo sound of a major thunder clap during a storm*”), adquiridos no endereço eletrônico <http://www.sound-effect.com>. O formato utilizado possui a vantagem de ser uma gravação que preserva todas as variações de frequência do som original.

A padronização do som foi feita através de um decibelímetro, modelo BK Precision 732A Sound Level Meters (figura 8) para que cada animal pudesse receber o mesmo estímulo sonoro.



Figura 8: A- decibelímetro modelo BK Precision 732A Sound Level Meters; B- cabo de transmissão de dados; C- cd com manual e *software* de instalação. Fonte: acervo pessoal.

O som foi padronizado a uma intensidade sonora máxima de 103-104 dB (figura 9), por ser uma pressão sonora capaz de aumentar as concentrações de cortisol sérico em cães, estando abaixo dos limites que poderiam causar danos ao aparelho auditivo (ISING et al., 1999).

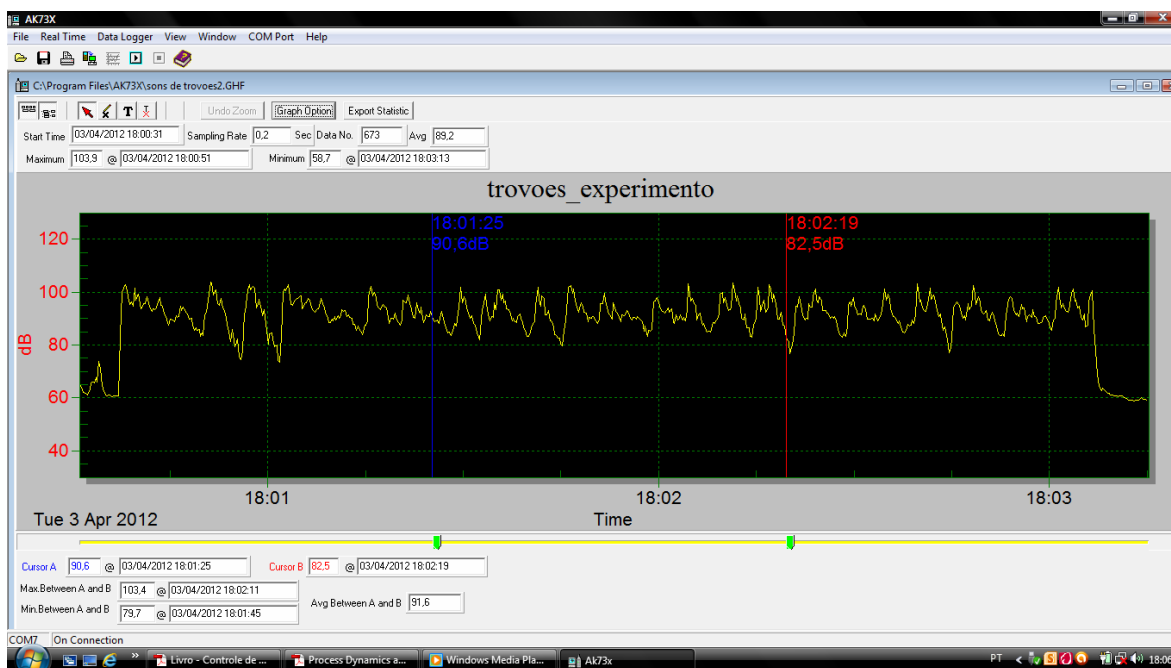


Figura 9: Gráfico do arquivo sonoro utilizado, apresentado em dB na razão do tempo. Intensidade sonora máxima de 103,9 dB, com duração de 2 minutos e 30 segundos.

3.7 Uso dos Freqüencímetros

Os IRR foram registrados através de freqüencímetros utilizando um sistema de gravação móvel (Polar® modelo RS800CX, figura 10), ligados ao tórax dos cães por uma faixa elástica. Nesta faixa existem dois eletrodos, que foram ajustados a cada animal para que um deles permaneça em contato com a região pré-cordial e o outro se situe exatamente em posição contralateral. Antes da adaptação da faixa ao animal, foi realizada tricotomia na região aonde os eletrodos permaneceram e posteriormente foi aplicado gel condutor para garantir a condução adequada dos pulsos cardíacos. O transmissor do sistema permanece adaptado entre os dois eletrodos e capta seus sinais enviando-os para o relógio do equipamento, que armazena estes dados.



Figura 10: Componentes do Polar modelo RS800CX: A- faixa com frequencímetros, B- transmissor, C- relógio, D- manual e cd de instalação do programa Polar Protrainer 5, E- Driver Polar IrDA USB Adapter (interface de emissão de infravermelho), F- cd de instalação da interface de emissão de infra-vermelho. Fonte: acervo pessoal.

3.8 Análise Espectral da VFC

Os dados armazenados no relógio foram enviados para o programa Polar Pro Trainer 5® (figura 11) por meio da interface de emissão de infravermelhos, para realizar a análise espectral da VFC.

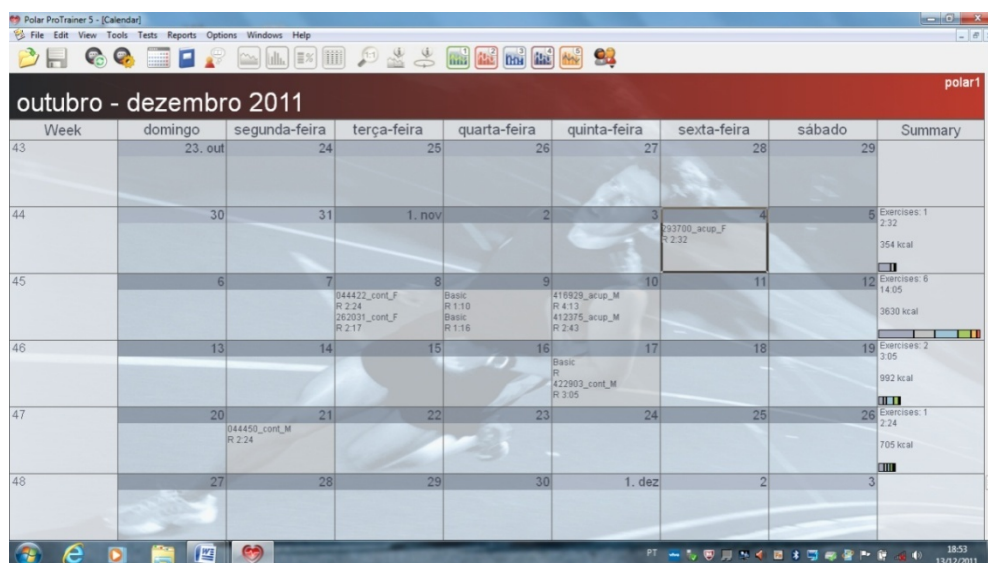


Figura 11: Tela inicial do programa Polar Pro Trainer 5®.

Os dados obtidos foram dispostos num gráfico confeccionado a partir da FC (bpm) em razão do tempo (figura 12).

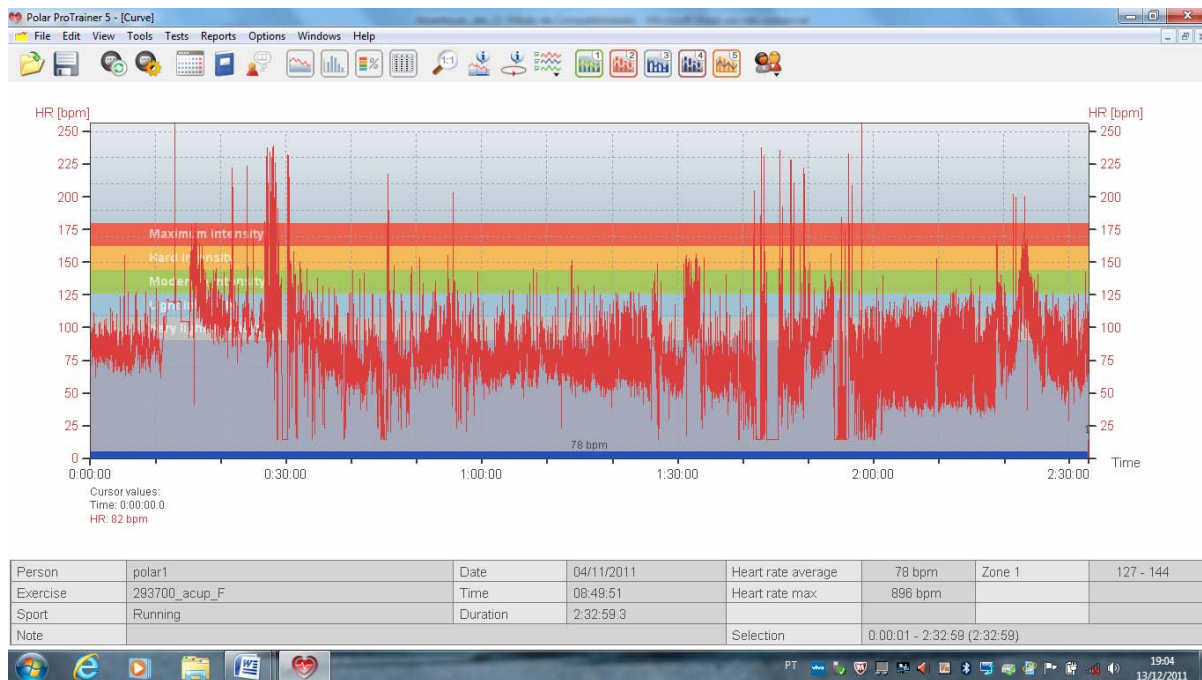


Figura 12: Gráfico confeccionado pelo programa Polar Pro Trainer 5®.

Os dados armazenados pelo programa Polar Protrainer 5 foram enviados para o programa Microsoft Office Excel 2007 sendo gerada uma lista de valores de intervalos RR em milisegundos (ms). A partir da lista de valores de intervalos RR foram selecionados os segmentos a serem analisados:

- Segmento basal: momento basal 2 (na sala de experimentação) com duração de 5 minutos;
- Segmento tratamento: durante o tratamento com duração de 5 minutos;
- Segmento estresse: selecionado durante o estímulo sonoro da diminuição abrupta dos intervalos RR (após o início do som) até, o fim do estímulo sonoro;
- Segmento pós-estresse: selecionado 30 minutos após o término do som com duração de 5 minutos.

Nos arquivos de Excel, foi realizada a correção de alguns artefatos de leitura através da substituição dos valores de intervalos RR discrepantes pela média dos valores dos dois IRR anteriores e dos dois posteriores (VON BORREL et al., 2007). Os segmentos foram enviados para o programa HRV analysis (figura 13) que gera uma página com os valores dos parâmetros da análise da VFC no domínio da frequência e no domínio do tempo, de cada segmento. (figura 14).

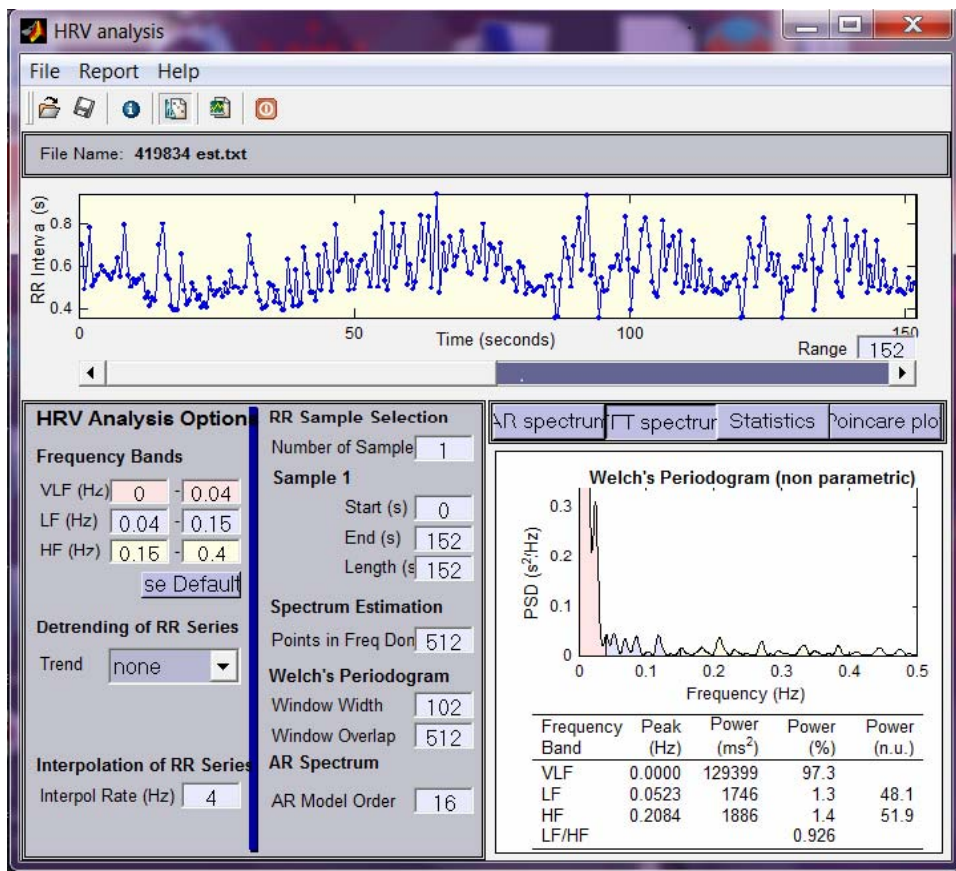


Figura 13: Tela do programa HRV analysis, demonstrando a razão entre os componentes de frequência LF e HF, a partir da FFT.

No presente estudo foi utilizada a Transformada Rápida de Fourier (FFT) para realizar a análise da VFC no domínio da frequência a partir da qual se obteve a razão entre os componentes frequenciais LF e HF. Essa razão permite identificar o balanço entre a ativação simpática e parassimpática nos momentos selecionados. Os valores das variáveis utilizadas pelo programa HRV analysis foram padronizados da seguinte forma: VLF– 0 a 0,04; LF 0,04 – 0,15; HF – 0,15 – 0,4; taxa de interpolação = 4 e pontos no domínio da frequência = 512

(PAGANI et al., 1986; LOMBARDI et al., 1996; MALLIANI et al., 1997; VON BORELL et al., 2007; HARADA et al., 2005).

Além disso, foram utilizados os parâmetros STDRR (desvio padrão de todos os intervalos RR do segmento); Mean HR (Frequência Cardíaca Média) e RMSSD (raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos entre batimentos consecutivos elevadas ao quadrado) para realizar a análise da VFC no domínio do tempo.

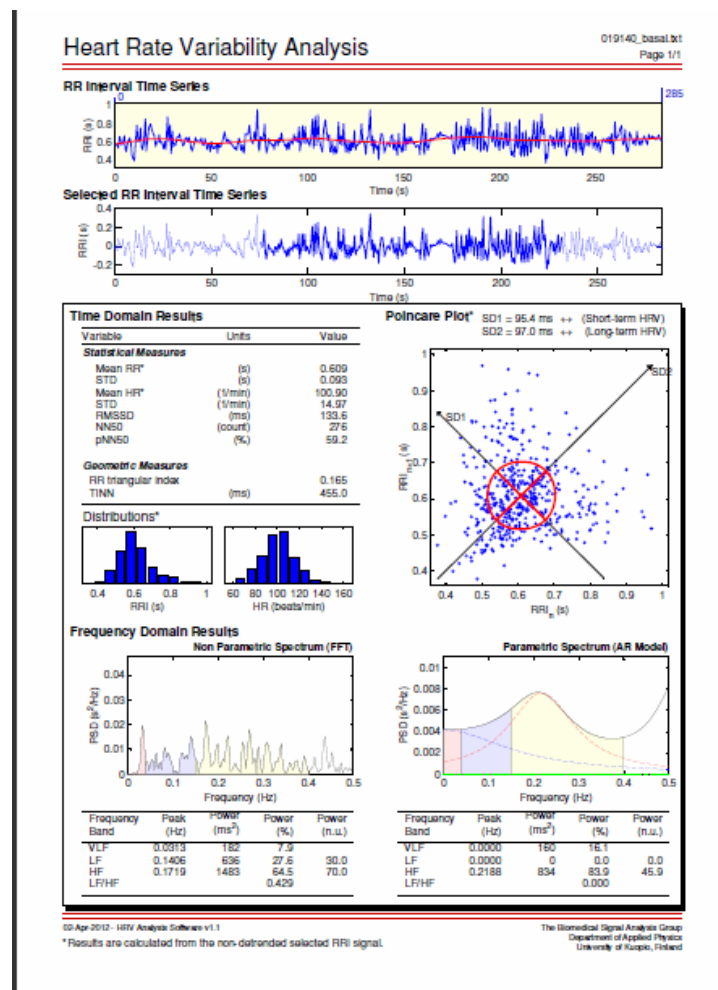


Figura 14: página gerada pelo programa HRV analysis com os valores dos parâmetros da análise da VFC no domínio da frequência e no domínio do tempo de um dos cães, no segmento basal.

3.9. Análise Comportamental

As alterações comportamentais, foram registradas por meio de filmagem no momento basal 2 (5 minutos), no momento do estímulo sonoro (2 minutos e 30 segundos) e no momento pós-estresse (5 minutos após o fim do estímulo sonoro). Foram analisados 14

parâmetros de alterações comportamentais como resposta ao estresse sonoro agudo: Arfar, tremer, postura de submissão, se esconder, procurar pessoas, vigilância, inquietação, vocalização, atitude destrutiva, salivação, eliminação, disparada, fugir da sala e sobressalto. A descrição dos parâmetros comportamentais analisados está detalhada na tabela 2. Os parâmetros foram classificados quanto a frequência de eventos observados em uma escala de 4 notas aonde: 0 = não observado, 1 = observado algumas vezes, 2 = observado frequentemente e 3 = observado durante todo o tempo de estímulo. Segundo descrito por Mills et al., 2003. A atribuição das notas dos parâmetros comportamentais foi realizada por um pesquisador que desconhecia a que grupo do experimento os animais pertenciam.

Tabela 2: Descrição dos 14 parâmetros comportamentais analisados.

Parâmetros	Descrição
Arfar	Aumento da frequência de inspiração e expiração em combinação com a abertura da boca.
Tremer	Evidência clara de tremor no corpo.
Postura de submissão	Se abaixar e permanecer em decúbito dorsal.
Se esconder	Procurar locais para se abrigar, como atrás e debaixo de móveis, e permanecer no local.
Procurar pessoas	Se deslocar deliberadamente para perto de uma pessoa, parando ao seu lado ou tentando interagir.
Vigilância	Estado de alerta constante em relação ao que está acontecendo no ambiente.
Inquietação	Estado de locomoção sem chegar a correr.
Vocalização	Emitir qualquer som vocal como: latir, ganir, chorar, rosnar.
Atitude destrutiva	Tentar cavar no ambiente ou arranhar e/ou morder objetos do ambiente.
Salivação	Aumento evidente da salivação ou aumento da frequência de deglutição da saliva.
Eliminação	Evacuar, urinar ou emese.
Disparada	Resposta exagerada de fuga correndo, para qualquer direção.
Fugir da sala	Intencionalmente tentar sair do local, procurando possíveis acessos de saída.
Sobressalto	Resposta exagerada de susto, levando o animal a pular para qualquer direção.

(Adaptado de Sheppard & Mills, 2003; Beerda et al., 1998)

3.10. Análise Estatística

A análise estatística dos dados de VFC (LF/HF, STDRR, FC média e RMSSD) foi realizada através da ANOVA de duas vias para medidas repetidas sendo realizado posteriormente o Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão.

Na análise estatística dos parâmetros comportamentais, os dados apresentaram distribuição próxima à normalidade sendo possível a realização da análise dos dados através da ANOVA de duas vias para medidas repetidas sendo realizado posteriormente o Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão.

O programa Graph Pad Prisma 5 foi utilizado para realizar todas as análises estatísticas e para confecção dos gráficos apresentados nos resultados.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca

Na análise da VFC no domínio da frequência, foi avaliada a razão entre os componentes frequenciais baixos e altos (LF/HF), que indica o balanço simpato-vagal. Os valores mais elevados da razão LF/HF indicam maior ativação simpática em relação à ativação vagal.

O teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou na razão LF/HF diferença significativa nos fatores: Tratamento ($F_{(2, 63)} = 12,46$; $p=0,0003$), Tempo ($F_{(3, 63)} = 157,4$; $p<0,0001$) e Interação ($F_{(6, 63)} = 11,42$; $p<0,0001$). Os três grupos demonstraram um aumento significativo da LF/HF no momento estresse em relação aos momentos basal e tratamento, demonstrando uma maior ativação do componente simpático em relação ao parassimpático, em todos os animais, durante o estímulo sonoro. Além disso, foi verificado o retorno aos valores de LF/HF apresentados antes do início do som, no momento pós-estresse (30 minutos após o término do estímulo) (figura 15).

O Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni detectou diferença significativa no momento estresse, onde o grupo ACUP apresentou valores significativamente menores que o CTL ($p<0,001$) e que o NP ($p<0,05$). Também no momento do estresse foi detectada diferença significativa entre os grupos NP e CTL ($p<0,001$). Desse modo, os dados evidenciam uma ativação simpática em relação à parassimpática menor no grupo tratado com acupuntura em relação aos grupos NP e CTL, durante o estímulo sonoro. Além disso, o grupo NP apresentou uma ativação simpática em relação à parassimpática significativamente menor em relação ao grupo CTL, no momento do estresse (figura 15).

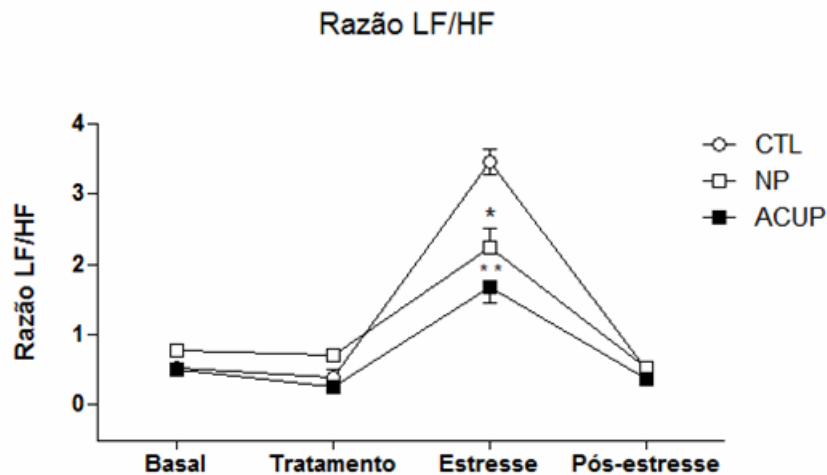


Figura15: Efeito da acupuntura na razão entre os componentes frequenciais LF/HF de cães submetidos ao estresse sonoro agudo. Antes do estresse sonoro (som de trovão, por 2 min e 30 s), cães da raça Beagle foram tratados com acupuntura por 20 min nos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (NP) e não tratados (CTL). Os dados são apresentados como média \pm epm da Razão LF/HF nos momentos basal, tratamento, estresse e pós-estresse. ** indica diferença significativa do grupo ACUP em relação aos grupos CTL ($P < 0,001$) e NP ($P < 0,05$) e * indica diferença significativa do grupo NP em relação ao grupo CTL ($P < 0,001$) (Teste de Bonferroni).

Os parâmetros de VFC no domínio do tempo analisados neste estudo foram: STDRR (desvio padrão de todos os intervalos RR do segmento); FC média (Frequência Cardíaca Média) e RMSSD (raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos entre batimentos consecutivos, elevadas ao quadrado).

O valor de STDRR, quando diminui, indica o incremento simpático. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator Tempo ($F_{(3,63)} = 6,281$; $P = 0,0008$), demonstrando uma menor influência simpática durante o momento tratamento e aumentando a ativação simpática no momento estresse. Não foram observadas diferenças significativas nos fatores tratamento e interação. No Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos (figura 16 A).

O valor de RMSSD aumentou conforme o incremento da ativação parassimpática. Na análise da RMSSD, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator Tempo ($F_{(3, 63)} = 8,047$; $p = 0,0001$), demonstrando uma maior ativação parassimpática durante o momento tratamento. Não foram observadas diferenças

significativas nos fatores tratamento e interação. No Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos (figura 16 B).

Os dados demonstram que não houve diferença estatística em relação à ativação vagal, entre os grupos em nenhum momento do experimento. Ainda assim pode se observar que o valor do parâmetro RMSSD no grupo ACUP indicou uma tendência a estar mais alto nos momentos tratamento e estresse, quando comparado aos grupos CTL e NP (figura 16 B).

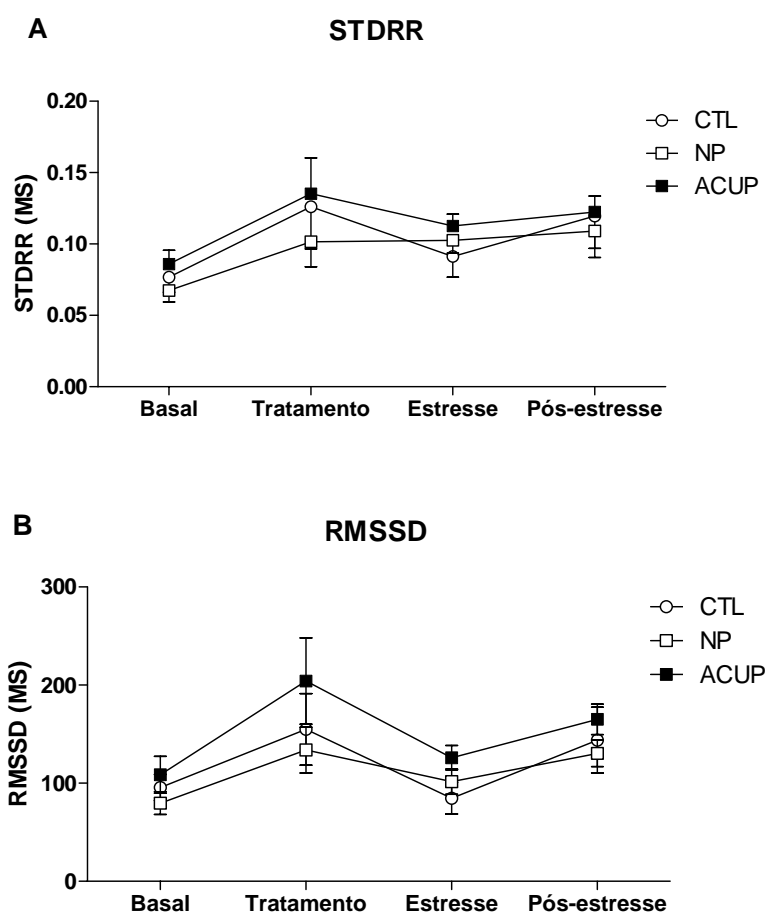


Figura16: Efeito da acupuntura no STDRR (Desvio padrão de todos os intervalos RR do segmento) (A) e no RMSSD (raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos entre batimentos consecutivos elevadas ao quadrado) (B) de cães submetidos ao estresse sonoro agudo. Os dados apresentados correspondem à STDRR em MS (milessegundos) \pm epm e à RMSSD em ms \pm epm nos momentos basal, tratamento, estresse e pós-estresse. Os animais receberam os seguintes tratamentos: CTL (vinte minutos em cima da bancada sem agulhas); NP (vinte minutos em cima da bancada com agulhas em pontos não correspondentes aos utilizados na acupuntura, próximos aos pontos VG20, *Yintang*, E36 bilateral, Pc6 bilateral e C7 bilateral); ACUP (vinte minutos em cima da bancada com agulhas nos pontos de acupuntura: VG20, *Yintang*, E36 bilateral, Pc6 bilateral e C7 bilateral). Na análise dos dados obtidos de STDRR e de RMSSD pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas não se detectaram diferenças significativas nos fatores tratamento, tempo e interação. O Teste de Bonferroni não detectou diferença significativa entre os grupos.

Na análise da FC média a ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores Tempo ($F_{(3, 63)} = 46,82$; $p < 0,0001$) e Interação ($F_{(6, 63)} = 3,61$; $p = 0,0039$). Assim como observado nos resultados da razão LF/HF, os três grupos demonstraram um aumento significativo da FC média, no momento estresse em relação aos momentos basal e tratamento, em todos os animais, durante o estímulo sonoro. Além disso, foi verificado o retorno aos valores de FC média apresentados antes do início do som, no momento pós-estresse (30 min após o término do estímulo).

O teste de Bonferroni, detectou diferença significativa no momento estresse entre os grupos ACUP e CTL ($p < 0,001$) e ACUP e NP ($p < 0,05$). Desse modo, o grupo CTL apresentou maior FC média entre os grupos, seguido do grupo NP, porém não foi detectada diferença significativa de FC média entre o grupo CTL e o grupo NP (figura 17).

Os dados apresentados de FC média, em conjunto com os resultados observados da razão LF/HF, podem indicar que o grupo tratado com acupuntura apresentou uma ativação simpática predominante sobre a parassimpática, no momento do estresse, significativamente menor que os grupos NP e CTL.

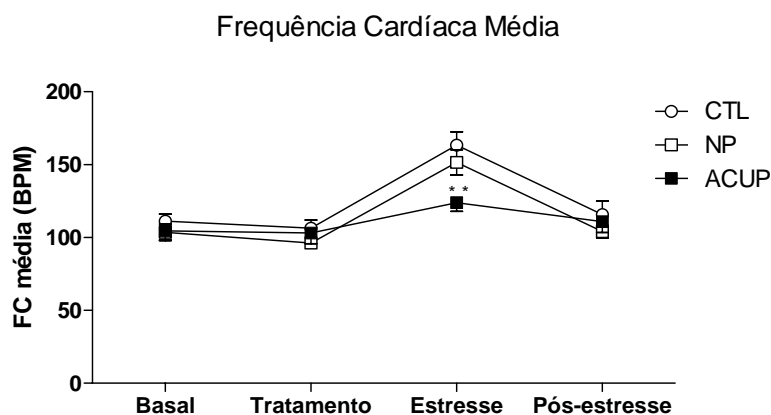


Figura 17: Efeito da acupuntura na FC média (Frequência Cardíaca Média) de cães submetidos ao estresse sonoro agudo. Antes do estresse sonoro (som de trovão, por 2,5min), cães da raça Beagle foram tratados com acupuntura por 20 min nos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (NP) e não tratados (CTL). Os dados são apresentados como FC média (Frequência Cardíaca Média) em BPM (batimentos por minuto) \pm epm nos momentos basal, tratamento, estresse e pós-estresse. ** indica diferença significativa do grupo ACUP em relação aos grupos CTL ($P < 0,001$) e NP ($P < 0,05$) no momento do estresse (Teste de Bonferroni).

4.2. Análise Comportamental

A análise das alterações comportamentais foi realizada a partir de filmagens realizadas durante o protocolo experimental. Sendo assim, foram avaliados 14 parâmetros comportamentais, e atribuiu-se um escore para cada alteração utilizando-se uma escala de notas de 0 a 3. Na tabela 3 estão apresentadas as médias \pm epm dos escores comportamentais de cada parâmetro analisado nos tempos basal, estresse e pós-estresse.

No momento basal, não houve diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros comportamentais analisados. No momento estresse, foi observado um aumento nas médias dos escores comportamentais dos parâmetros: arfar, tremer, se esconder, vigilância, inquietação, salivação, disparada, fugir da sala, e sobressalto. De maneira geral, o grupo tratado com acupuntura apresentou redução destes comportamentos quando comparado aos grupos CTL e NP. O grupo NP apresentou escores comportamentais intermediários em relação aos grupos ACUP e CTL.

Além disso, durante o estímulo sonoro, foi evidenciada diferença significativa entre os tratamentos nos parâmetros: arfar, se esconder, inquietação, disparada, fugir e sobressalto. O grupo tratado com acupuntura apresentou menores escores em relação aos parâmetros citados quando comparado aos grupos CTL e NP. O grupo NP apresentou escores comportamentais intermediários em relação aos grupos CTL e ACUP (ver detalhes na tabela 3).

Nos parâmetros procurar por pessoas, vigilância, vocalização, eliminação, tremer e salivação não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. No entanto, o grupo ACUP apresentou uma tendência a escores de tremer e salivação, menores que os grupos CTL e NP. Os parâmetros postura de submissão e atitude destrutiva não foram observados em nenhum dos animais participantes do experimento.

Tabela 3: Respostas comportamentais de cães submetidos ao estresse sonoro agudo.

Parâmetros	Basal			Estresse			Pós-estresse		
	CTL	NP	ACUP	CTL	NP	ACUP	CTL	NP	ACUP
Arfar	0,00	0,50±0,37	0,00	1,00±0,42	0,25±0,25 ⁺	0,25±0,16 ⁺	0,00	0,00	0,00
Tremer	0,00	0,00	0,00	2,38±0,32	2,00±0,37	1,63±0,46	1,25±0,36	1,13±0,35	0,38±0,26
Submissão	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Esconder	0,00	0,00	0,13±0,12	2,25±0,25	2,38±0,26	0,63±0,26*	1,63±0,46	0,38±0,26 ⁺	0,50±0,37 ⁺
Proc. pess.	0,63±0,32	0,63±0,26	0,75±0,25	0,25±0,16	0,75±0,25	0,25±0,25	0,50±0,37	0,38±0,26	0,25±0,16
Vigilância	0,75±0,25	0,63±0,18	0,38±0,18	2,88±0,12	2,63±0,26	2,38±0,37	1,50±0,37	0,88±0,22	1,25±0,36
Inquietação	0,75±0,36	0,50±0,18	0,25±0,16	2,13±0,39	1,25±0,45	0,63±0,26 ⁺	0,50±0,32	0,38±0,26	0,13±0,12
Vocalização	0,00	0,00	0,00	0,25±0,16	0,00	0,13±0,12	0,25±0,25	0,00	0,00
Atit. dest	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Salivação	0,00	0,13±0,12	0,00	1,63±0,37	1,63±0,32	0,88±0,39	0,75±0,36	0,25±0,16	0,38±0,37
Eliminação	0,63±0,18	0,50±0,18	0,50±0,18	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Disparada	0,00	0,00	0,00	2,13±0,39	1,25±0,45 ⁺	0,25±0,16*	0,13±0,12	0,00	0,00
Fugir da sala	0,00	0,00	0,00	2,13±0,35	1,38±0,49	0,38±0,26*	0,25±0,16	0,13±0,12	0,00
Sobressalto	0,00	0,13±0,12	0,00	1,38±0,46	1,25±0,49	0,00*	0,00	0,13±0,12	0,00

A tabela descreve as médias de cada alteração comportamental analisada nos grupos CTL, NP e ACUP, nos tempos: basal, estresse e pós-estresse. Os dados são apresentados como escores comportamentais ± epm em uma escala de quatro notas aonde: 0= não observado; 1 = observado algumas vezes; 2= observado frequentemente e 3 = observado durante todo o tempo de estímulo.* indica diferença significativa do grupo ACUP em relação aos grupos CTL e NP no momento estresse.⁺ indica diferença significativa do grupo ACUP ou NP em relação ao grupo CTL no momento estresse ou no pós-estresse (Teste de Bonferroni).

O teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas, em relação ao parâmetro arfar detectou diferença significativa somente no fator Tempo ($F_{(2, 42)} = 4,083$; $p = 0.024$). O Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni demonstrou que o grupo ACUP e o grupo NP apresentaram escores comportamentais significativamente menores que o grupo CTL ($p < 0,05$) no momento estresse (Figura 18).

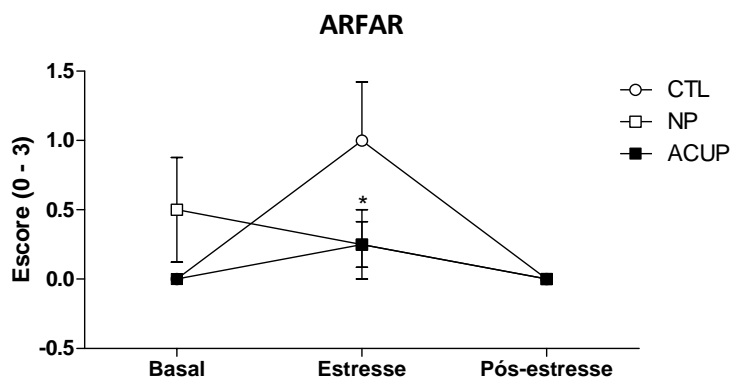


Figura 18: Efeito da acupuntura no parâmetro comportamental arfar de cães submetidos ao estresse sonoro agudo. Antes do estresse sonoro (som de trovão, por 2,5min), cães da raça Beagle foram tratados com acupuntura por 20 min nos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (NP) e não tratados (CTL). Os dados são apresentados como escore comportamental (0 a 3), nos momentos basal, estresse e pós-estresse. * indica diferença significativa do grupo ACUP em relação ao grupo CTL ($P < 0,05$) e do grupo NP em relação ao grupo CTL ($P < 0,05$) no momento estresse (Teste de Bonferroni).

O teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas, em relação ao parâmetro se esconder, detectou diferença significativa nos fatores Tratamento ($F_{(2, 42)} = 5,035$; $p = 0,0164$), Tempo ($F_{(2,42)} = 44,43$; $p < 0,0001$) e Interação ($F_{(4,42)} = 8,653$; $p < 0,0001$). O Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni demonstrou que no momento estresse o grupo ACUP demonstrou menores alterações em relação a esse parâmetro apresentando diferença significativa em relação ao grupo CTL ($P < 0,001$) e ao grupo NP ($P < 0,05$). No momento pós-estresse foi detectada diferença significativa entre o grupo ACUP e o grupo CTL ($P < 0,05$) e entre o grupo NP e CTL ($P < 0,01$) (figura 19).

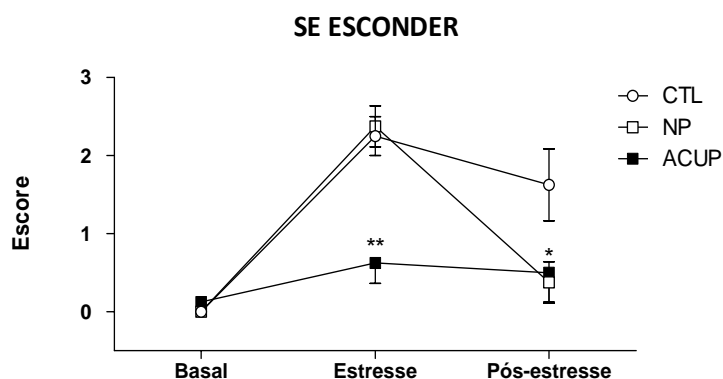


Figura 19: Efeito da acupuntura no parâmetro comportamental se esconder de cães submetidos ao estresse sonoro agudo. Antes do estresse sonoro (som de trovão, por 2,5 min), cães da raça Beagle foram tratados com acupuntura por 20 min nos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (NP) e não tratados (CTL). Os dados são apresentados como escore comportamental (0 a3), nos momentos basal, estresse e pós-estresse. ** indica diferença significativa do grupo ACUP em relação aos grupos CTL ($P<0,001$) e NP ($P<0,001$) no momento estresse e * indica diferença significativa do grupo ACUP em relação ao grupo CTL ($P<0,05$) e do grupo NP em relação ao grupo CTL ($P<0,01$) no momento pós-estresse (Teste de Bonferroni).

O parâmetro inquietação, quando testado pelo ANOVA de duas vias para medidas repetidas, apresentou diferença significativa nos fatores Tratamento ($F_{(2, 42)}=3,903$; $p=0,0362$) e Tempo ($F_{(2,42)}= 11,24$; $p<0,0001$). O Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni demonstrou que no momento estresse o grupo ACUP apresentou escores comportamentais significativamente menores em relação ao grupo CTL ($P<0,01$) (figura 20).

Os dados apresentados demonstram menores escores comportamentais em relação ao parâmetro inquietação no grupo tratado com acupuntura quando comparado ao grupo NP, porém não foi detectada diferença significativa entre eles ao se utilizar o Teste de Bonferroni. O grupo NP apresentou menores escores comportamentais em relação a esse parâmetro quando comparado ao grupo CTL, porém o Teste de Bonferroni não detectou diferença significativa entre os grupos citados.

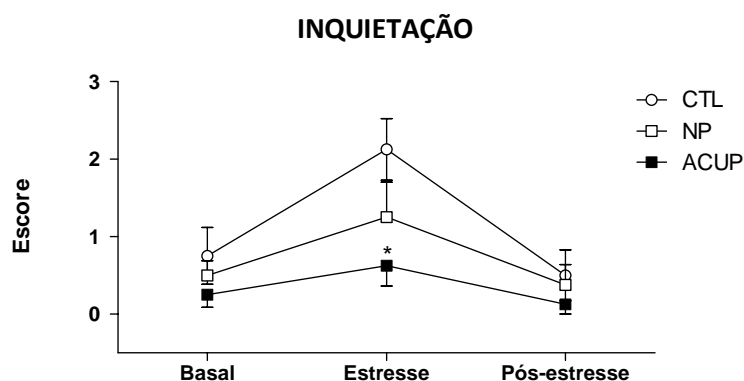


Figura 20: Efeito da acupuntura no parâmetro comportamental inquietação de cães submetidos ao estresse sonoro agudo. Antes do estresse sonoro (som de trovão, por 2,5min), cães da raça Beagle foram tratados com acupuntura por 20 min nos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (NP) e não tratados (CTL). Os dados são apresentados como escore comportamental (0 a3), nos momentos basal, estresse e pós-estresse. * indica diferença significativa do grupo ACUP em relação aos grupos CTL ($P < 0,01$) (Teste de Bonferroni).

O teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas, em relação ao parâmetro disparada, detectou diferença significativa nos fatores: Tratamento ($F_{(2, 42)} = 6,857$; $p = 0,0051$), Tempo ($F_{(2,42)} = 32,52$; $p < 0,0001$) e Interação ($F_{(4,42)} = 6,360$; $p = 0,0004$). O Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni detectou diferença significativa entre o grupo ACUP e o grupo CTL ($P < 0,001$) e entre o grupo ACUP e o grupo NP ($P < 0,01$) no momento estresse, demonstrando que o grupo ACUP apresentou escores comportamentais menores quando comparado aos grupos CTL e NP. O grupo NP apresentou diferença significativa em relação ao grupo CTL ($P < 0,05$) no momento estresse, apresentando menores escores comportamentais quando comparado ao grupo CTL (figura 21).

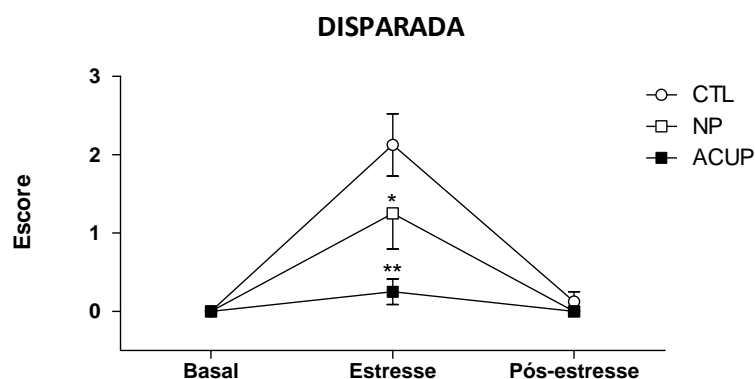


Figura 21: Efeito da acupuntura no parâmetro comportamental disparada de cães submetidos ao estresse sonoro agudo. Antes do estresse sonoro (som de trovão, por 2,5min), cães da raça Beagle foram tratados com acupuntura por 20 min nos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (NP) e não tratados (CTL). Os dados são apresentados como escore comportamental (0 a 3), nos momentos basal, estresse e pós-estresse. ** indica diferença significativa do grupo ACUP em relação aos grupos CTL ($P \leq 0,001$) e NP ($P \leq 0,001$) no momento do estresse e * indica diferença significativa do grupo NP em relação ao grupo CTL ($P < 0,05$) no momento do estresse (Teste de Bonferroni).

O parâmetro fugir da sala apresentou diferença significativa no teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas nos fatores: Tratamento ($F_{(2, 42)} = 6,558$; $p=0,0061$), Tempo ($F_{(2,42)} = 27,78$; $p < 0,0001$) e Interação ($F_{(4,42)} = 4,118$; $p=0,0066$). O Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni detectou diferença significativa do grupo ACUP em relação ao grupo CTL ($P < 0,001$) e ao grupo NP ($P < 0,01$), demonstrando que no momento estresse o grupo ACUP apresentou menores escores relativos ao parâmetro fugir da sala quando comparado aos grupos NP e CTL. O grupo NP não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo CTL (figura 22).

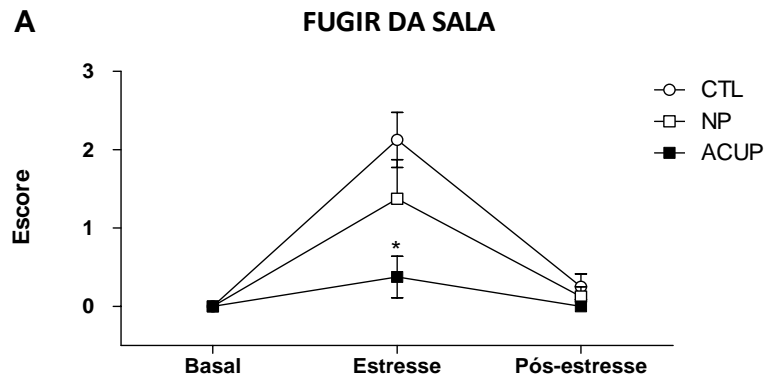


Figura 22: Efeito da acupuntura no parâmetro comportamental fugir da sala de cães submetidos ao estresse sonoro agudo. Antes do estresse sonoro (som de trovão, por 2,5min), cães da raça Beagle foram tratados com acupuntura por 20 min nos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (NP) e não tratados (CTL). Os dados são apresentados como escore comportamental (0 a 3), nos momentos basal, estresse e pós-estresse.* indica diferença significativa do grupo ACUP em relação aos grupos CTL ($P < 0,001$) e NP ($P < 0,01$) no momento do estresse. (Teste de Bonferroni).

O parâmetro sobressalto foi o que apresentou maior diferença do grupo tratado com acupuntura em relação aos demais grupos, uma vez que nenhum dos animais pertencentes ao grupo ACUP apresentou essa alteração comportamental. Em relação a esse parâmetro, o teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores: Tratamento ($F_{(2, 42)} = 4,175$; $p = 0,0297$), Tempo ($F_{(2,42)} = 13,08$; $p < 0,0001$) e Interação ($F_{(4,42)} = 3,369$; $p = 0,0177$). O Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni demonstrou que no momento do estresse o grupo ACUP apresentou diferença significativa em relação ao grupo CTL ($P < 0,001$) e ao grupo NP ($P < 0,001$). O grupo NP não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo CTL (figura 23).

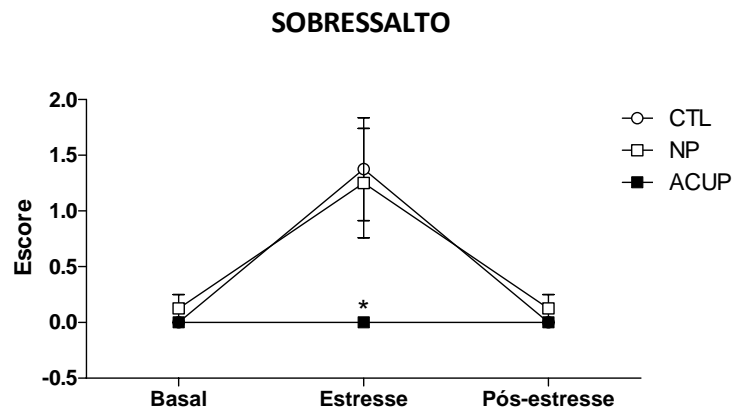


Figura 23: Efeito da acupuntura no parâmetro comportamental sobressalto de cães submetidos ao estresse sonoro agudo. Antes do estresse sonoro (som de trovão, por 2,5min), cães da raça Beagle foram tratados com acupuntura por 20 min nos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG20, *Yintang*, E36, Pc6 e C7 (NP) e não tratados (CTL). Os dados são apresentados como escore comportamental (0 a 3), nos momentos basal, estresse e pós-estresse.* indica diferença significativa do grupo ACUP em relação aos grupos CTL ($P < 0,001$) e NP ($P < 0,001$) no momento do estresse (Teste de Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo demonstrar o balanço simpato-vagal, através da análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca e as respostas comportamentais de cães submetidos a um modelo de estresse sonoro agudo quando tratados com um protocolo clínico de acupuntura. O tratamento com acupuntura nos pontos VG20, *Yintang*, Pc6, C7, e E36, por 20 minutos, foi realizado apenas uma vez, antes do estímulo sonoro.

5.1 O Modelo de Estresse Sonoro Agudo em Cães

Situações de estresse sonoro agudo são capazes de desencadear comportamentos de luta ou fuga através de mecanismos neurais que levam à ativação do SNA (WESTMAN & WALTERS, 1981; PASSCHIER-VERMEER & PASSCHIER, 2000; PRIOR, 2006). Sendo assim, no presente estudo foi utilizado um modelo de estresse sonoro agudo em cães da raça Beagle, com objetivo de acessar e analisar algumas respostas autonômicas (análise da VFC) e comportamentais.

Ao realizar a análise espectral da Variabilidade da Frequência Cardíaca, nosso estudo evidenciou que os três grupos apresentaram um aumento significativo na razão LF/HF e na FC média, no momento estresse em relação aos momentos basal, tratamento e pós-estresse, sugerindo que durante o estímulo sonoro houve um aumento na regulação da atividade simpática em relação à regulação parassimpática em todos os animais. Ainda foi observado que não houve diferenças significativas nos valores de LF/HF e FC média entre os momentos basal, tratamento e no momento pós-estresse nos três grupos experimentais, sugerindo que não houve diferença na regulação autonômica nesses momentos. Os parâmetros RMSSD (aumenta conforme o incremento da ativação vagal) e STDRR (quando aumenta indica menor ativação simpática), se mantiveram maiores nos três grupos, durante o momento tratamento indicando maior incremento vagal e menor ativação simpática. Desta forma, o modelo utilizado foi capaz de promover aumento do balanço simpato-vagal que consiste num importante indicativo de estresse.

A análise da VFC durante o estresse sonoro em cães é extremamente relevante, pois permite acessar o balanço autonômico independentemente de outros fatores que alteram a FC.

No repouso, a regulação parassimpática predomina e quando ocorre aumento na atividade física, há um incremento da ativação simpática. Ainda assim, os dois ramos do SNA possuem a habilidade de atuar de forma simultânea ou independente um do outro, na regulação da atividade cardíaca. Sendo assim, o aumento da atividade vagal não resulta instantaneamente na redução da simpática e vice-versa. Desse modo, não é possível determinar as características regulatórias do SNA, simplesmente, através da mensuração da FC (VON BORELL et al., 2007). Ainda assim, a FC pode ser considerada como um índice indireto de estresse, sendo importante a sua análise, em conjunto com outros parâmetros. A análise espectral da VFC, tendo como parâmetro principal a razão LF/HF, que permite uma determinação mais precisa da regulação funcional do SNA, em resposta ao estresse psicológico e fisiológico já que estados psicológicos podem ter um impacto no balanço simpato-vagal sem, necessariamente vir seguido de alterações na frequência cardíaca e/ou respiratória (STAUSS, 2003).

Até o presente momento não foram encontrados estudos publicados no ocidente que tenham avaliado a VFC em cães submetidos a modelos de estresse sonoro. No entanto, nossos resultados adicionam e confirmam evidências apresentadas em trabalhos anteriores onde estímulos sonoros de alta intensidade têm sido considerados estressores tanto em animais como no homem. Estudos relatam o aumento na frequência cardíaca média em animais submetidos a sons de alta intensidade (ENGELAND et al., 1990), além disso, a exposição aguda a sons acima de 90 dB é capaz de estimular o SNS, aumentando a liberação de adrenalina e noradrenalina (ISING et al., 1999). Beerda e colaboradores (1998) estudaram os níveis de cortisol e a frequência cardíaca em cães saudáveis submetidos a um protocolo de estresse sonoro agudo, onde foi utilizada uma intensidade sonora de 110 -120 dB, com duração de 2 segundos, repetida por três vezes com intervalos de 30 segundos. Este estudo evidenciou um aumento significativo nos níveis de cortisol salivar, ao comparar com os animais antes do estímulo, nos tempos: 10, 15 e 30 minutos após a exposição ao som. No entanto não houve diferenças significativas na frequência cardíaca, já que foram detectadas frequências cardíacas muito altas antes do som, provavelmente devido a condições pré-estímulo não controladas. Em outro estudo do mesmo autor, foi utilizado um som de intensidade sonora de 95 dB durante 6, 12 e 18 minutos que produziu um aumento gradativo na FC média de 25, 35 e 54% respectivamente. Também foi verificado o aumento nos níveis de cortisol salivar durante o estímulo demonstrando níveis gradativamente mais elevados conforme o aumento da duração do som (10, 14, 24 mmol/L) (BEERDA et al., 1997).

Ising e colaboradores (1999) demonstraram o aumento dos níveis plasmáticos de adrenalina, noradrenalina, ACTH e cortisol em cães expostos a sons com intensidade sonora de 75 dB e duração de 3 minutos. As catecolaminas tiveram seus níveis elevados em 3 vezes, 1 minuto após a exposição sonora. O ACTH teve aumento de 1,4 vezes, verificado 5 a 15 minutos após o som. Os níveis de cortisol aumentaram em 11 vezes, 12 minutos após o término do estímulo sonoro. Outro estudo verificou aumento significativo da FC média, do hematócrito e dos níveis de cortisol de cães após serem submetidos a um modelo de estresse sonoro onde dois tiros de arma de fogo eram disparados a 50 metros do animal (SANDBERG et al., 2004).

Em relação aos parâmetros comportamentais avaliados em nosso estudo, a análise estatística demonstrou que durante o estímulo sonoro houve aumento significativo nos três grupos em relação aos momentos basal nos parâmetros: arfar, tremer, se esconder, vigilância, inquietação, salivação, disparada, fugir da sala, e sobressalto. Além disso, o parâmetro se esconder continuou a ser observado em alguns animais após o estímulo sonoro. O estresse sonoro não alterou a respostas de procurar por pessoas, vocalização e eliminação e os parâmetros postura de submissão e atitude destrutiva não foram observados nem antes nem depois do estresse em nenhum dos animais estudados.

As respostas comportamentais ao estresse sonoro têm sido estudadas, tanto em animais como em humanos, uma vez que refletem, em geral, o bem-estar e saúde do indivíduo (BEERDA et al., 1997; WESTMAN & WALTERS, 1981; PASSCHIER-VERMEER & PASSCHIER, 2000). O estudo de Beerda e colaboradores de 1997 que utilizou um som de intensidade sonora de 95 dB durante 6, 12 e 18 minutos observou alterações comportamentais significativas nos parâmetros: arfar, tremer, lambe o focinho e postura baixa do corpo, cauda e orelhas. No entanto estímulos sonoros de 70, 78 e 87 dB durante 30 minutos não foi capaz de produzir alterações comportamentais significativas. Em outro estudo Beerda e colaboradores (1998) utilizaram estímulos sonoros de 110 -120 dB, com duração de 2 segundos, 3x com intervalos de 30 segundos entre eles, sendo observada aumento significativo das alterações comportamentais de postura muito baixa do corpo, orelhas e cauda, 10 minutos após o estímulo sonoro .

Em 2003, Mills e colaboradores relataram alterações comportamentais em 48 cães saudáveis de raças distintas, submetidos a sons de fogos de artifício reais (festa local), na presença de seus donos. Os cães utilizados no estudo tinham histórico de medo de sons altos e os parâmetros comportamentais foram avaliados por seus donos durante o período de duração

dos fogos de artifício. Os autores não tiveram controle da intensidade sonora a que os cães foram submetidos e por qual período de tempo. Em uma escala de escores de 0 a 3, os parâmetros arfar, tremer, inquietação e se esconder apresentaram média 3 em todos os cães avaliados, os parâmetros postura de submissão, procurar pelo dono, vigilância e sobressalto apresentaram nota 2 de média e os parâmetros correr em disparada e fugir, média 1.

Neste sentido, o modelo utilizado no presente estudo foi capaz de acessar algumas alterações comportamentais importantes em resposta ao estresse sonoro agudo. Estas respostas, principalmente se esconder, inquietação, disparada, fuga e sobressalto são geralmente observadas na vida cotidiana de cães e podem se tornar perigosas para os animais e um transtorno para os proprietários (BEERDA et al., 1997).

O modelo de estresse sonoro agudo apresentado por nosso estudo demonstrou as seguintes vantagens no acesso às respostas autonômicas e comportamentais de cães saudáveis.

- Os cães que participaram do estudo, pertencentes ao canil experimental do DPA da UFRRJ, são da mesma raça, possuem temperamento dócil e estão acostumados ao mesmo manejo diário e à coletas de sangue o que proporciona uma resposta mais padronizada em relação ao manejo durante o protocolo e ao modelo de estresse.
- No nosso modelo o som foi padronizado a uma intensidade sonora máxima de 103 - 104 dB, por ser uma pressão sonora capaz de gerar respostas fisiológicas e comportamentais de estresse em cães, estando abaixo dos limites que poderiam causar danos ao aparelho auditivo. O estímulo sonoro de som de trovão consistiu numa gravação com duração de 2 minutos e 30 segundos sendo assim, foi possível realizar o controle do tempo de estímulo e da intensidade sonora, tornando fácil a sua reprodução.
- A avaliação comportamental também teve êxito uma vez que os cães se adaptaram bem ao local, não demonstrando alterações no momento basal. Essa padronização de manejo possibilitou que os animais respondessem livremente ao estímulo sonoro, sem a influência de outros fatores como interações diferenciadas com pessoas e presença de outros animais.
- O uso do frequencímetro se mostrou um recurso não invasivo, por ser leve e não incomodar o animal, além de ser de baixo custo. Sendo assim, os animais permaneceram à vontade, com os frequencímetros posicionados corretamente durante todo o protocolo experimental, sendo possível, posteriormente, acessar os dados de VFC.

O nível de cortisol é considerado um dos principais parâmetros para se avaliar níveis de estresse em cães, constituindo uma evidência da ativação do Eixo HHA, um dos principais sistemas acionados em situações de estresse. Em nosso estudo, amostras de sangue foram coletadas nos tempos: basal (C0), 15 min pós-estresse (C1) e 45 min pós-estresse (C2), para análise do cortisol sérico, porém não houve tempo hábil para realização das análises, devido ao atraso na chegada dos kits de Radioimunoensaio. O soro está acondicionado à temperatura de -80°C e as análises serão realizadas em breve.

5.2 Acupuntura e Estresse

No presente estudo, a análise espectral da VFC, demonstrou uma redução significativa da razão LF/HF no grupo tratado com acupuntura em relação aos grupos NP e CTL, durante o estímulo sonoro, evidenciando uma menor ativação simpática em relação à parassimpática. Além disso, o grupo NP também apresentou valores significativamente menores da razão LF/HF em relação ao CTL, no momento do estresse, apresentando valores intermediários entre o CTL e ACUP. O grupo ACUP, apresentou os valores significativamente mais baixos de FC média entre os grupos estudados. O grupo CTL apresentou a maior FC média entre os grupos, seguido do grupo NP, porém não foi detectada diferença significativa entre eles. Além disso, os resultados do presente estudo, ainda demonstraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos nos parâmetros RMSSD (aumenta conforme o incremento da ativação vagal) e STDRR (quando aumenta indica menor ativação simpática). Sendo assim, esses resultados sugerem não haver diferença estatística em relação à ativação vagal e à ativação simpática separadamente, entre os grupos em nenhum momento do experimento. Ainda assim pode se observar que os valores de RMSSD e STDRR no grupo tratado com acupuntura demonstraram uma tendência a estarem mais altos durante o tratamento e durante o estímulo sonoro, quando comparado aos grupos CTL e NP.

Devemos destacar que a análise da VFC no domínio da frequência é mais precisa na mensuração do balanço simpato-vagal, que a análise no domínio do tempo. Os valores de RMSSD e STDRR são capazes de indicar a ocorrência de aumento ou diminuição, além da média, das atividades do SNS e do SNP (VON BORELL et al, 2007), não sendo possível demonstrar através desses parâmetros a ativação total dos dois ramos autonômicos. Sendo esta, uma possível explicação para a não verificação de diferenças significativas nesses parâmetros, entre os tratamentos no momento do estresse sonoro.

Desse modo, a análise da razão LF/HF aponta para um desbalanço significativo na regulação autonômica, com uma maior evidência da ativação simpática em relação à parassimpática no momento do estresse e onde o grupo tratado com acupuntura nos pontos VG20, *Yintang*, Pc6, C7 e E36 apresentaram uma, significativamente, menor alteração do balanço simpato-vagal em relação aos grupos NP e CTL. Além disso, a acupuntura em não pontos parece ter apresentado um efeito similar ao observado no tratamento com acupuntura, porém com menor intensidade.

Estudos anteriores utilizaram a análise da VFC para demonstrar as respostas autonômicas ao estresse em indivíduos tratados com acupuntura. Imai e colaboradores (2009) estudaram os efeitos da acupuntura em ratos submetidos a um modelo de estresse de restrição de movimentos (90 minutos). Nesse estudo foi verificado que a eletroacupuntura (10Hz) no ponto E36, reduziu significativamente a FC média e o valor do componente frequencial LF quando comparado ao grupo controle. E ainda, o grupo tratado demonstrou aumento significativo do componente frequencial HF. Em humanos, Li e colaboradores (2005), verificaram um aumento significativo nos valores de HF e um decréscimo nos valores de LF e da razão LF/HF, em indivíduos tratados com acupuntura após dirigirem por três horas seguidas, comparados ao grupo tratado com não pontos. Em 2011, Hwang e colaboradores estudaram os efeitos da acupuntura na VFC em enfermeiras que trabalhavam no turno da noite. Foi escolhida uma combinação de pontos utilizada na acupuntura tradicional coreana: VB44, VB43, F1 e B66 e observou-se que o grupo tratado com acupuntura apresentou menores valores de LF e da razão LF/HF, além de um maior valor de HF quando comparado ao grupo tratado com não pontos. Sendo assim, os resultados apresentados em estudos em ratos e humanos corroboram com nossos resultados, demonstrando que a acupuntura pode promover inibição da atividade simpática associada à estimulação da atividade parassimpática durante o estresse.

A análise das alterações comportamentais demonstrou que a acupuntura nos pontos VG20, *Yintang*, Pc6, C7 e E36 reduziu significativamente as respostas comportamentais de arfar, se esconder, inquietação, disparada, fugir da sala e sobressalto no momento do estresse sonoro em relação ao grupo não tratado. Além disso, também no momento do estresse, observou-se que o tratamento com acupuntura nos pontos produziu escores significativamente menores nos parâmetros se esconder, disparada, sobressalto e fugir da sala que o grupo tratado com não pontos. Foi particularmente interessante observar que o parâmetro sobressalto não foi observado em nenhum dos animais pertencentes ao grupo tratado com

acupuntura. No grupo tratado com acupuntura em não pontos houve redução significativa dos comportamentos arfar e disparada em relação ao grupo não tratado no momento do estresse. Nosso estudo ainda evidenciou diferenças significativas no período pós-estresse no parâmetro se esconder, demonstrando que os grupos ACUP e NP apresentaram redução significativa desse parâmetro quando comparado ao grupo CTL. Nos parâmetros procurar por pessoas, vigilância, vocalização, eliminação, tremer e salivação não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. No entanto, o grupo tratado com acupuntura apresentou uma tendência a escores menores de tremer e salivação, no momento do estresse, que os grupos CTL e NP.

Efeitos fisiológicos e comportamentais do tratamento com acupuntura já foram demonstrados em estudos anteriores. Liu e colaboradores (2011) utilizou um modelo de estresse crônico imprevisível para induzir depressão em ratos. No grupo tratado com eletroacupuntura nos pontos VG20 e EX17, observou-se a reversão significativa do déficit comportamental induzido pelo modelo de depressão. Outro estudo em ratos utilizou um modelo de estresse de separação materna no qual o grupo tratado com acupuntura no ponto C7 apresentou redução dos níveis de corticosterona e ACTH plasmáticos, demonstrando uma modulação do eixo HHA. Além disso, foi verificada a redução de alterações comportamentais relacionadas à ansiedade no grupo tratado com acupuntura (PARK et al., 2011). Yang e colaboradores (2002) estudaram os efeitos da EA nos pontos Pc6 e C3 e nos pontos F11 e TA5 em ratos submetidos a um modelo de estresse de imobilização. Nesse estudo foi verificado que o tratamento com acupuntura nos pontos Pc6 e C3 produziu um decréscimo significativo na FC e na pressão arterial durante o período de estresse, quando comparado ao grupo tratado com os pontos F11 e TA5 e o grupo não tratado. Os níveis plasmáticos de catecolaminas também foram avaliados, sendo evidenciado que seus valores permaneceram elevados em todos os grupos do experimento, durante todo o período de imobilização, com exceção do grupo tratado com os pontos Pc6 e C3, o qual demonstrou um decréscimo significativo nos níveis de ambas as catecolaminas, durante o estresse, caindo ainda mais ao final do período de estresse, chegando a níveis próximos do basal. Kim e colaboradores (2009) demonstraram os efeitos do tratamento com acupuntura no ponto Pc6 em um modelo de estresse crônico em ratos. O estudo evidenciou que o tratamento com acupuntura atenuou significativamente os níveis de comportamentos relacionados à ansiedade e perda da memória nesse modelo de estresse. Todas as evidências experimentais apresentadas se encaixam com o

que nós observamos com os cães que utilizamos em nosso experimento, apesar do modelo de estresse utilizado ter sido diferente.

Estudos em humanos vêm demonstrando os efeitos benéficos do tratamento com acupuntura em diversas modalidades de estresse. Pavão e colaboradores (2010) demonstraram os efeitos da acupuntura nos pontos E36, F4 e BP6 em adultos jovens (23 a 38 anos) e de idade avançada (60 a 81 anos), que sofriam de estresse crônico. Foi verificado, em ambos os grupos tratados com acupuntura, uma redução significativa nos escores de comportamentos relacionados à depressão, ansiedade e estresse. Além disso, foi evidenciado um aumento na proliferação de linfócitos T, sendo que esse aumento se mostrou significativo nos indivíduos com mais idade. Outro estudo utilizou um protocolo clínico de acupuntura (pontos básicos: VG20, VG24, *Yintang*, F4, Pc6, E36 e R3) para tratar indivíduos com histórico de estresse crônico. O estudo demonstrou uma redução significativa de diversos sintomas relacionados ao estresse nos indivíduos tratados com acupuntura, sendo mais observada a redução da sensação de cansaço e ansiedade (HUANG et al., 2011). Sendo assim, os resultados apresentados, em humanos e animais, evidenciam a eficácia da acupuntura, quando realizada em pontos específicos indicados para o tratamento de distúrbios provenientes de situações causadoras de estresse tanto crônico como agudo.

Apesar dos estudos experimentais demonstrarem resultados satisfatórios, os mecanismos pelos quais a acupuntura age em sua modulação central não estão totalmente esclarecidos. Alguns trabalhos demonstraram algumas áreas centrais que estariam envolvidas com a estimulação pela acupuntura promovendo uma reversão de déficits gerados pelo estresse. Manni e colaboradores (2009) demonstraram que camundongos submetidos ao modelo de estresse social por isolamento tiveram uma redução cognitiva, que é uma característica desse modelo. Quando tratados com EA no ponto E36 apresentaram uma melhora cognitiva e esta foi atribuída a uma modulação de neurotrofinas no estriato e no hipocampo que são regiões que tem um papel importante no processo de memória e aprendizado. Kim e colaboradores (2011) observaram que a EA no ponto Pc6 foi capaz de promover uma melhora da memória no modelo de estresse crônico que está relacionada com a atividade da acetilcolinesterase (AChE), dessa forma, os animais tratados com EA tiveram um aumento na reatividade da AChE no hipocampo comparado com o grupo controle. Liu e colaboradores (2011) constataram um bloqueio do efeito do estresse induzindo o déficit comportamental pela eletroacupuntura e esta melhora comportamental parece estar associada a uma reversão da atrofia glial.

Os resultados apresentados no presente estudo reforçam e acrescentam evidências da eficácia do tratamento clínico com um protocolo de acupuntura tradicional para reduzir os efeitos fisiológicos e comportamentais decorrentes de estímulos estressores. Nos nossos resultados observamos que a acupuntura foi capaz de reduzir significativamente o comportamento de estresse e que o grupo NP ficou em um nível intermediário entre o grupo ACUP e o CTL. O efeito da estimulação de não-pontos foi observado em vários estudos anteriores (MEDEIROS et al., 2001) e pode estar relacionado tanto com a estimulação de pontos de acupuntura de outros meridianos como ao efeito da estimulação da pele em regiões inespecíficas (regiões que realmente não são consideradas acupontos). Em humanos os pontos de acupuntura estão bem definidos, mas quando se faz a transposição para espécies menores a chance de acertar um acuponto de outro meridiano é grande. Desta forma, no presente estudo não descartamos a possibilidade de estimulação de outros acupontos. No entanto, também devemos considerar que a estimulação sensorial *per se* também pode provocar algum efeito e que não existe uma característica dicotomizada entre o efeito da estimulação de pontos e não pontos. Na verdade a proposta é que a melhor combinação de pontos produza um efeito mais intenso que outras combinações. Como no nosso trabalho, os animais tratados nos pontos de acupuntura tiveram um destaque maior em relação aos demais grupos, nossos resultados corroboram com um dos tópicos mais importantes da acupuntura que é a importância da especificidade dos pontos. Para a MTC, para que se obtenha eficácia no tratamento com acupuntura é necessário que o tratamento seja conduzido por um profissional da área, conhecedor da localização, indicações e efeitos clínicos dos acupontos.

Os efeitos da acupuntura no tratamento de distúrbios de estresse realizada em pontos indicados pela MTC têm se mostrado eficazes em estudos clínicos e experimentais. Sendo assim, a acupuntura parece modular o eixo HHA e o balanço simpato-vagal no sentido de manter o equilíbrio homeostático, além de atuar no SNC atenuando os efeitos do estresse em estruturas reconhecidamente afetadas nessas situações. Como mencionado anteriormente, esta ação central da acupuntura também promove diminuição dos distúrbios psicológicos e comportamentais relacionados às desordens decorrentes do estresse agudo e crônico. Assim a redução dos comportamentos de estresse, demonstrados neste estudo, podem estar relacionados à redução da ativação de estruturas centrais. No entanto apenas estudos que avaliem a ativação cerebral poderiam confirmar esta hipótese.

Mediante todos os benefícios promovidos pela acupuntura em modelos experimentais de estresse, nossos resultados demonstraram um efeito positivo da acupuntura no tratamento de distúrbios comportamentais em cães. Dessa forma, facilitando o manejo de cães saudáveis em situações de estresse, diminuindo parâmetros comportamentais, que são característicos do estresse como disparada, tentativa de fuga, sobressalto e inquietação que quando exagerados, como é o caso de animais com distúrbios comportamentais, podem se tornar um transtorno tanto para os animais como para o homem. Em última análise, o presente estudo demonstrou o efeito promissor da acupuntura no tratamento de distúrbios de estresse em cães.

6 CONCLUSÕES

O modelo de estresse sonoro agudo (som de trovão de intensidade máxima de 103-104 dB, por 2,5 minutos) produziu um aumento significativo na razão LF/HF e na FC média no momento estresse em relação aos momentos basal, tratamento e pós-estresse, sugerindo um aumento na atividade simpática em relação à parassimpática caracterizando uma ativação autonômica indicativa de estresse.

O modelo de estresse sonoro agudo (som de trovão de intensidade máxima de 103-104 dB, por 2,5 minutos) produziu um aumento significativo, durante o estímulo sonoro, nos comportamentos de: arfar, tremer, se esconder, vigilância, inquietação, salivação, disparada, fugir da sala, e sobressalto. Além disso, o parâmetro se esconder continuou a ser observado em alguns animais após o estímulo sonoro. Desta forma, o modelo utilizado foi capaz de gerar alterações comportamentais características de estresse.

A acupuntura nos pontos VG20, *Yintang*, Pc6, C7 e E36, por 20 minutos, realizada antes do estresse, foi capaz de:

- Reduzir significativamente a razão LF/HF e a FC média no grupo tratado com acupuntura em relação aos grupos NP e CTL, durante o estímulo sonoro, evidenciando uma menor ativação simpática em relação à parassimpática.
- Reduzir significativamente os parâmetros comportamentais arfar, se esconder, inquietação, disparada, fugir da sala e sobressalto no momento do estresse sonoro em relação ao grupo controle não tratado (CTL).
- Produzir escores comportamentais significativamente menores nos parâmetros se esconder, disparada, sobressalto e fugir da sala que o grupo tratado com não pontos.
- Não produzir a resposta comportamental de sobressalto em nenhum dos animais.

O tratamento realizado em não pontos foi capaz de:

- Produzir valores significativamente menores da razão LF/HF em relação ao CTL, no momento do estresse, apresentando valores intermediários entre o grupo CTL e ACUP indicando uma redução do balanço simpato-vagal.

- Reduzir significativamente os comportamentos arfar e disparada em relação ao grupo não tratado no momento do estresse.

A redução do balanço simpato-vagal produzida pela acupuntura pode ter ocorrido através de uma inibição simpática associada à estimulação parassimpática.

Nos nossos resultados observamos que a acupuntura nos pontos VG20, *Yintang*, Pc6, C7 e E36 foi capaz de reduzir significativamente as respostas comportamentais e autonômicas induzidas pelo estresse e que a acupuntura em não-pontos produziu efeito semelhante mas com intensidade muito reduzida.

Dessa forma, nossos dados sugerem que a acupuntura constitui uma terapia promissora no tratamento de distúrbios físicos e comportamentais de estresse em cães, mas ainda se faz necessário mais estudos para elucidar os mecanismos fisiológicos associados a esta melhora.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKANA, S. F.; DALLMAN, M. F.; BRADBURY, M. J.; SCRIBNER, K. A.; STRACK, A. M.; WALKER, C. D. Feedback and facilitation in the adrenocortical system: unmasking facilitation by partial inhibition of the glucocorticoid response to prior stress. **Endocrinology**. V.131, p.57-68, 1992.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOFF, J.A.R.; DE VRIES, H. W.; MOL, J.A. Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**. V. 58, p. 365-381, 1998.

BEERDA, B.; SCHILDER, M. B. H.; VAN HOOFF, J.A.R.; DE VRIES, H. W. Manifestations of chronic and acute stress in dogs. **Applied Animal Behaviour Science**. V. 52, p. 307-319, 1997.

BEERDA, B.; SCHILDER, M.; BERNADINA, W.; HOOFF, J.; VRIES, H.; MOL, J. Chronic Stress in Dogs Subjected to Social and Spatial Restriction. II. Hormonal and Immunological Responses. **Physiology and Behavior**. V.66, n. 2, p. 243-254, 1999.

BERGERON R.; SCOTT, S. L.; EMOND, J. P.; MERCIER, F.; COOK, N.J.; SCHAEFER, A.L. Physiology and Behavior of Dogs During Air Transport. **Canadian Journal of Veterinary Research**. V.66, p.211–216, 2002.

CAO, X.D.; XU, S.F.; LU, W.X. Inhibition of Sympathetic Nervous System by Acupuncture. **Acupuncture Electro-therapy Research**. V 8, p. 25–35, 1983.

CHANG, Y. H.; HISEH, M. T.; WU, C. R. Effect of acupuncture at bai-hui on the deficit of memory storage in rats. **The American Journal of Chinese Medicine**. V.27, p.289-298, 1999.

CHROUSOS, G. P.; LORIAUX, D. L.; GOLD, P. W. Mechanisms of physical and emotional stress. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. V.245, p.3-11, 1988.

DE KLOET, E. R.; OITZL, M. S.; JOËLS, M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? **Trends in Neurosciences** V.22, p.422-26, 1999.

DRAEHMPAEHL, D.; ZOHMANN, A. **Acupuntura no Cão e no Gato – Princípios Básicos e Prática Científica**. São Paulo: Roca, 1997, 245 p.

ENGELAND, W. C.; MILLER, P.; GANN, D. S. Pituitaryadrenal and adrenomedullary responses to noise in awake dogs. **The American Physiology Society**. V. 2, p. 285, 1990.

FOCKS, C.; MARZ, U. **Guia Prático de Acupuntura**. Barueri, SP: Manole, 2008, 697 p.

FRANCI, C. R. Estresse: Processos adaptativos e não adaptativos. In: ANTUNES-RODRIGUES, J. **Neuroendocrinologia Básica Aplicada**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, cap.15, p.210-223.

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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 12, p.1445-1450. 1997.

GUO, Y.; SHI, X.; UCHIYAMA, H.; HASEGAWA, A.; NAKAGAWA, Y.; TANAKA, M.; FUKUMOTO, I. A study on the rehabilitation of cognitive function and short-term memory in patients with Alzheimer's disease using transcutaneous electrical nerve stimulation. **Frontiers of Medical & Biological Engineering**. V. 11, n. 4, p. 237-247, 2002.

HAINSWORTH R. The control and physiological importance of heart rate. In: MALIK, M.; CAMM, A. J. **Heart Rate Variability**. Armonk, N.Y.: Futura, 1995, p. 3–19.

HARADA, T.; ABE, J.; SHIOTANI, M.; HAMADA, Y.; HORII, I. Effect of autonomic nervous function on QT interval in dogs. **The Journal of Toxicological Sciences**. V. 30, n.3, p. 229-237, 2005.

HAVERBEKE, A.; DIEDERICH, C.; DEPIEREUX, E. Cortisol and Behavioral Responses of Working Dogs to Environmental Challenges. **Physiology and Behavior**. V. 93, p. 59-67, 2008.

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

HIBY, E. F.; ROONEY, N. J.; BRADSHAW, J. W. S. Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels. **Physiology and Behavior**. V.89, p. 385–391, 2006.

HUANG , W.; HOWIE, J.; TAYLOR, A.; ROBINSON, N. An investigation into the effectiveness of traditional Chinese acupuncture (TCA) for chronic stress in adults: A randomised controlled pilot study. **Complementary Therapies in Clinical Practice**. V. 17, p. 16 - 21, 2011.

HWANG, D. S.; KIM, H. K.; SEO, J. C.; SHIN I. H.; KIM, D. H.; KIM, Y. Sympathomodulatory effects of Saam acupuncture on heart rate variability in night-shift-working nurses. **Complementary Therapies in Medicine**. V. 19S, p. 33 – 40, 2011.

IMAI, K.; ARIGA, H.; TAKAHASHI, T. Electroacupuncture Improves Imbalance of Autonomic Function under Restraint Stress in Conscious Rats. **The American Journal of Chinese Medicine**. V. 37, n. 1, p. 45–55, 2009.

ISING, H.; BABISCH, W.; KRUPPA, B. Noise-induced endocrine effects and cardiovascular risk. **Noise and Health**. V.1, p. 37-48, 1999.

JAGGAR, D. History and basic introduction to veterinary acupuncture. **Problems in Veterinary Medicine**. V.4, n.1, p.1-11, 1992.

JANG, M. H.; SHIN, M. C.; LEE, T. H.; LIM, B. V.; SHIN, M. S.; MIN B. I.; KIM, H.; CHO, S.; KIM, E. H.; KIM, C. J. Acupuncture suppresses ischemia-induced increase in c-Fos

expression and apoptosis in the hippocampal CA1 region gerbils. **Neuroscience Letters**. V. 347, n.1, p. 5-8, 2003.

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.

JONES, A. C.; JOSEPHS, R. A. Interspecies hormonal interactions between man and the domestic dog (*Canisfamiliaris*). **Hormones and Behavior**. V. 50, p. 393–400, 2006.

KAWASE, M.; KOMATSU, T.; NISHIWAKI, K.; KOBAYASHI, M.; KIMURA, T.; SHIMADA, Y. Heart Rate Variability and Arterial Blood Pressure Variability Show Different Characteristic Changes During Hemorrhage in Isoflurane-Anesthetized, Mechanically Ventilated Dogs. **International Anesthesia Research Society**. V. 94, p. 16-21, 2002.

KIM, H.; PARK, H.; HAN, S.; HAHM, D.; LEE, H.; KIM, K.; SHIM, I. The effects of acupuncture stimulation at PC6 (Neiguan) on chronic mild stress-induced biochemical and behavioral responses. **Neuroscience Letters**. V. 460, p. 56–60, 2009.

KIM, H.; PARK, H.; SHIM, H.; HAN, S.; HAHM, D.; LEE, H.; SHIM, I. The effects of acupuncture (PC6) on chronic mild stress-induced memory loss. **Neuroscience Letters**. V. 488, p. 225–228, 2011.

KING, T.; HEMSWORTH, P.H.; COLEMAN, G.J. Fear of Novel and Startling Stimuli in Domestic Dogs. **Applied Animal Behaviour Science**. V. 82, p. 45–64, 2003.

LEE, H.; LEE, B.; CHOI, S.; HAHM, D. Electroacupuncture Reduces Stress-Induced Expression of c-Fos in the Brain of the Rat. **The American Journal of Chinese Medicine**. V. 32, n. 5, p. 795–806, 2004.

LI, Z.; WANG C.; MAK, A. F.; CHOW, D. H. Effects of acupuncture on heart rate variability in normal subjects under fatigue and non-fatigue state. **European Journal of Applied Physiology**. V. 94, p. 633-640, 2005.

LIAO, Y. Y.; SETO, K.; SAITO H.; FUJITA, M.; KAWAKAMI, M. Effects of acupuncture on adrenocortical hormone production: II. Effect of acupuncture on the response of adrenocortical hormone production to stress. **The American Journal of Chinese Medicine**. V. 8, p. 160 – 166, 1980.

LIMEHOUSE, J. B.; TAYLOR-LIMEHOUSE, P. A. Conceitos Orientais da Acupuntura. In: SHOEN, A. M. **Acupuntura Veterinária**. 2 ed. São Paulo: ROCA, 2006, cap.6, p.76-90.

LIU, Q.; LI, B.; ZHU, H.; WANG, Y.; YU, J.; WU, G. Glia atrophy in the hippocampus of chronic unpredictable stress-induced depression model rats is reversed by electroacupuncture treatment. **Journal of Affective Disorders**. V. 128, p. 309–313, 2011.

LOMBARDI, F. Spectral Analysis of Heart Rate Variability. **Cardiac Electrophysiology Review**. V. 3, p. 335-337, 1997.

LOMBARDI, F.; MALLIANI, A.; PAGANI, M.; CERUTTI, S. Heart rate variability and its sympatho-vagal modulation. **Cardiovascular Research**. V. 32, p. 208-216, 1996.

MACIOCIA, G. **Fundamentos da medicina chinesa**. São Paulo: ROCA, 1996, 658 p.

MALLIANI, A.; MONTANO, N.; PAGANI, M. Physiological Background of Heart Rate Variability. **Cardiac Electrophysiology Review**. V. 3, p. 343-346, 1997.

MANN, F. **Acupuntura: a arte chinesa de curar**. São Paulo: Hemus, 1982, 208p.

MANNI, L.; ALOE, L.; FIORE, M. Changes in cognition induced by social isolation in the mouse are restored by electro-acupuncture. **Physiology & Behavior**. V. 98, p. 537–542, 2009.

MANTEUFFEL, G. Central nervous regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and its impact on fertility, immunity, metabolism and animal welfare, a review. **Arch Tierz**. V. 45, p. 575–595, 2002.

MARQUES, A. H.; SILVERMAN, M. N.; STERNBERG, E. M. Evaluation of Stress Systems by Applying Noninvasive Methodologies: Measurements of Neuroimmune Biomarkers in the Sweat, Heart Rate Variability and Salivary Cortisol. **Neuroimmunomodulation**. V. 17, p. 205-208, 2010.

MC EWEN, B. S. Neuroendocrine Interactions. In BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. **Psychopharmacology: the fourth generation of progress**. Nova York: American College of Neuropsychopharmacology, 2000.

MC EWEN, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiology Review**. V. 87, p. 873–904, 2007.

MEDEIROS, M. A. **Mapeamento através da expressão de c-Fos das estruturas encefálicas envolvidas na acupuntura analgésica (ponto Zusanli) em animais imobilizados**. In: Departamento de Psicobiologia. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2001, p. 129.

MIDDLEKAUFF, H. R.; YU, J. L.; HUI, K. Acupuncture effects on reflex responses to mental stress in humans. **American Journal of Physiology**. V.280, p.462-468. 2001.

MILLS, D. S.; GANDIA ESTELLES, M.; COLESHAW, P. H.; SHORTHOUSE, C. Retrospective analysis of the treatment of firework fear in dogs. **Veterinary Record**. V. 153, p. 561-562, 2003.

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

MOORE, R.; Neuroendocrine Systems: I. The Brain-Pituitary-Adrenal Axis Mediates Response to Stress. **Fundamental Neuroscience**. P. 1137-1147, 1999.

MORMÈDE, P.; ANDANSON, S.; AUPÉRIN, B.; BEERDA, B.; GUÉMÉNÉ, D.; MALMKVIST, J.; MANTECA X; MANTEUFFEL, G.; PRUNET, B.; REENEN, C.G.; RICHARD, S.; VEISSIER, I. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. **Journal of affective disorders**. V. 91, p. 113-124, 2006.

NASCIMENTO, J. H. M.; CARVALHO, A. C. C. Efeitos do Sistema Nervoso Autônômico sobre Coração e Vasos. In: CURI, C.; PROCOPIO, J. **Fisiologia Básica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, cap.25, p.383-385.

PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. **Endocrine Reviews**. V. 22 n. 4, p. 502-548, 2001.

PAGANI, M.; LOMBARDI, F.; GUZZETTI, S; RIMOLDI, O.; FURLAN, R.; PIZZINELLI, P.; SANDRONE, G.; MALFATTO, G.; DELL'ORTO, S.; PICCALUGA, E.; TURIEL, M.; BASELLI, G.; CERUTTI, S.; MALLIANI, A. Power Spectral Analysis of Heart Rate and Arterial Pressure Variabilities as a Marker of Sympatho-Vagal Interaction in Man and Conscious Dog. **Circulation Research**. V. 59, p. 178-193, 1986.

PARK, H. J.; LIM, S.; LEE, H-S.; YOO, Y-M.; LEE, H. J.; KIM, S. A.; YIN, C-S.; SEO, J-C.; CHUNG, J-H. Acupuncture enhances cell proliferation in dentate gyrus of maternally-separated rats. **Neuroscience Letters**. V.319, n.3, p.153-156, 2002.

PARK, H. J.; PARK, H. J; CHAE, Y.; KIM, J.; LEE, H.; CHUNG, J. Effect of Acupuncture on Hypothalamic–Pituitary–Adrenal System in Maternal Separation Rats. **Cellular and Molecular Neurobiology**. V. 31, n. 8, p. 1123-1127, 2011.

PASSCHIER – VERMEER, W.; PASSCHIER, W. F. Noise Exposure and Public Health. **Environmental Health Perspectives**. V. 108, p. 123-131, 2000.

PAVÃO, T. S.; VIANNA, P.; PILLAT, M. M.; MACHADO, A. B.; BAUER, M. E. Acupuncture is effective to attenuate stress and stimulate lymphocyte proliferation in the elderly. **Neuroscience Letters**. V. 484, p. 47–50, 2010.

PICCIRILLO, G.; OGAWA, M.; SONG, J.; CHONG, V.; JOUNG, B.; HAN, S.; MAGRI, D.; CHEN, L.; LIN, S.; CHEN, P. Power spectral analysis of heart rate variability and autonomic nervous system activity measured directly in healthy dogs and dogs with tachycardia-induced heart failure. **Heart Rhythm Society**. V. 6, n. 4, p. 546-552, 2009.

PORGES, S. W. The polyvagal theory: phylogenetic contributions to social behavior. **Physiology and Behavior**. V. 79, p. 03-13, 2003.

PRIOR, H. Effects of the acoustic environment on learning in rats. **Physiology and Behavior**. V. 87, p. 162-165, 2006.

ROONEY, J.; GAINES, A.; BRADSHAW, W. S.; Behavioral and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kenneling: Investigation mitigation of stress by prior habituation. **Physiology and Behavior**. V. 92, p. 847-854, 2007.

SANDBERG, E. H.; VON WALTER, L. W.; HÖGLUND, K.; SVARTBERG, K.; SWENSON, L.; FORKMAN, B. Physiological Reactions to Fear Provocation in Dogs. **Journal of Endocrinology**. V.180, p. 439-448, 2004.

SAPOLSKY, R. M. **Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death**. Cambridge, Ma: Mit Press, 1992, 427 p.

SCHOEN, A.M. **Veterinary acupuncture**. Saint Louis: Mosby, 2 ed, 2001, cap. 53, p. 127-148.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**. V.138, p.32, 1936.

SHEPPARD, G.; MILLS, D. S. Evaluation of dog-appeasing pheromone as a potential treatment for dogs fearful of fireworks. **Veterinary Record**. V. 152, p.432-436, 2003.

SONG, J.; OGAWA, M.; TAN, A.; CHEN, P.; LIN, S. Heart Rate Variability and Autonomic Nerve Activities in Ambulatory Dogs. **28th EMBS Annual International Conference**. p. 1780-1783, 2006.

STAUSS, H. M. Physiologic mechanisms of heart rate variability. **Revista Brasileira de Hipertensão**. V. 14, n. 1, p. 8-15, 2007.

STAUSS, H. M. Heart rate variability. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. V.285, p.927-931, 2003.

SVARTBERG, K.; FORKMAN, B.; Personality Traits in the Domestic Dog (*Canis familiaris*). **Applied Animal Behaviour Science**. V.79, p. 133-155, 2002.

TIRGOVISTE, C. I. Anatomic and functional particularities of skin areas used in acupuncture. **American Journal of Acupuncture**. V. 3, p.199-206, 1975.

ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, L. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**. V.10, p.397-409, 2009.

VON BORELL, E.; LANGBEIN, J.; DESPRÉS, G.; HANSEN, S.; LETERRIER, C.; MARCHANT-FORDE, J.; MARCHANT-FORDE, R.; MINERO, M. F.; MOHR, E.; PRUNIER, A.; VALANCE, D.; VEISSIER, I. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals .A review. **Physiology & Behavior**. V. 92, p 293-316, 2007.

WEN, T. S. **Acupuntura clássica chinesa** .2.ed. São Paulo: Cultrix, 1989, 225 p.

WESTMAN, J. C.; WALTERS, J. R. Noise and Stress: a Comprehensive Approach. **Environmental Health Perspectives**. V. 41, p.291-309, 1981.

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

2005.

XIE, H.; PREAST, V. **Xie`s Veterinary Acupuncture**. Oxford: Blackwell, 2007, cap. 2, 376 p.

YAMAMURA ,Y. **Acupuntura Tradicional: a Arte de Inserir**. São Paulo: Roca, 2 ed, 1993. 980 p.

YANG, C. H.; LEE, B.B.; JUNG, H.S.; SHIM, I.; ROH, P.U.; GOLDEN, G. T. Effect of Electroacupuncture on Response to Immobilization Stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. V. 72, p. 847–855, 2002.

YAO, T.; ANDERSON, S.; THOREN, P. Long Lasting Cardiovascular Depression Induced by Acupuncture-like Stimulation of the Sciatic Nerve in Unanesthetized Spontaneously Hypertensive Rats. **Brain Research**. V.240, p. 77-85, 1982.

YAO, T., ANDERSON, S.; THOREN, P. Long Lasting Cardiovascular Depressor Response Following Sciatic Stimulation in Spontaneously Hypertensive Rats. Evidence for the Involvement of Central Endorphin and Serotonin Systems. **Brain Research**. V. 244(2) p. 295– 303, 1982.

YUN, S-J.; PARK, H-J.; YEOM, M-J.; HAHN, D-H.; LEE, H. J.; LEE, E. H. Effect of electroacupuncture on stress-induced changes in brain-derived neurotrophic factor expression in rat hippocampus. **Neuroscience Letters**. V. 318, n.2, p.85-88, 2002.

8 ANEXOS

8.1. Ficha de Protocolo Experimental

Data:		Pesquisador:							
Experimento:									
Nº do chip:	Nome:			Idade:	Peso:	Sexo:			
Grupo:									
Temperamento:									
Exame clínico									
Temperatura:					Mucosas:			Ausculta:	
Otológico:									
Protocolo experimental:									
	Basal 1	transp.	chegada	Basal 2	coleta 1	Tratam	som	coleta 2	coleta3
Tempo:									
Escore comportamental:									
	COMPORTAMENTO	NOTA							
1	arfar								
2	tremer								
3	postura de submissão								
4	se esconder								
5	procurar por pessoas								
6	vigilância								
7	inquietação								
8	vocalização								
9	atitude destrutiva								
10	salivação								
11	eliminação								
12	disparada								
13	fugir da sala								
14	sobressalto								
Escala de quatro notas: 0 = não observado, 1 = observado algumas vezes, 2= observado frequentemente e 3 = observado durante todo o tempo de estímulo									
Observações:									