

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

DISSERTAÇÃO:

**EFEITO DA ACUPUNTURA NAS RESPOSTAS DE ESTRESSE
EM EQUINOS: TESTES LABORATORIAL E A CAMPO**

Julia Dias Villas Boas

2013



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

**EFEITO DA ACUPUNTURA NAS RESPOSTAS DE ESTRESSE
EM EQUINOS: TESTES LABORATORIAL E A CAMPO**

JULIA DIAS VILLAS BOAS

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
Janeiro de 2013

636.10895892 Villas Boas, Julia Dias, 1985-
V726e Efeito da acupuntura nas respostas de
estresse em eqüinos : testes laboratorial e a
campo/ Julia Dias Villas Boas. - 2013.
T 88 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. 65-72.

1. Eqüino - Doenças - Terapêutica - Teses.
2. Eqüino - Doenças - Teses. 3. Cavalo - Efeito
do stress - Teses. 4. Acupuntura veterinária -
Teses. I. Medeiros, Magda Alves de, 1973- II.
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa 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

JULIA DIAS VILLAS BOAS

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)

Pablo Ignacio Trigo (Ph. D) - Universidade La Plata (CONICET)

Márcia Valéria Rizzo Scognamillo Szabó (Ph. D)

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus amados pais
Julio e Alice por me ensinarem a trilhar os
caminhos da vida;
a minha irmã Mariana sempre presente na
minha vida e companheira;
a minha avó Neyde, minha grande
incentivadora.

AGRADECIMENTOS

Aos meus amados pais Julio e Alice e a minha irmã que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

A minha avó Neyde pelas maravilhosas conversas e por sempre acreditar em mim.

Ao Carlos, pelo companheirismo, paciência e, principalmente, por fazer parte da minha vida.

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

A todos os meus mestres que participaram dessa etapa de minha formação, em especial a Fernando Queiroz de Almeida e Pablo Trigo, pelas inúmeras idéias, discussões, por seus preciosos esclarecimentos às minhas dúvidas, e boa vontade e disposição de ajudar em todos os momentos.

A professora Norma Almeida que disponibilizou sua preciosa ajuda na análise do Cortisol pela técnica de Radioimunoensaio.

A Thais Codeço, Lucas Marinho, Juliana Azevedo e Agnaldo Andrade que me ajudaram e deram força durante a parte prática do trabalho.

Ao cavalo, espécie animal sublime.

A todos da Escola de Equitação do Exército que disponibilizaram os animais e infra-estrutura para realização do experimento, e por estarem sempre dispostos a ajudar em todos os momentos do trabalho, em especial ao Sgt. Lima Gomes, Capitão Fabrício e Major Collete.

Aos cavaleiros Sgt. Lima Gomes, Ten. Matta, Ten. Gargantilha, Ten. Silas Rabelo, Ten. Ivo e Ten. Guarienti e aos juízes oficiais da CBH fundamentais para execução do nosso estudo.

As amigas Anne, Nat e Amanda, que tornaram essa jornada mais divertida.

As minhas lindas amigas Carol e Carolzinha, pela amizade, momentos inesquecíveis, pelas conversas e desabafos; e por estarem sempre presentes na minha vida.

E agradeço, especialmente a minha orientadora Magda Alves de Medeiros, pela oportunidade, confiança e ensinamentos. Por acreditar em mim e me mostrar o caminho da ciência. E, principalmente, pelo carinho e amizade que surgiu ao longo desse caminho.

RESUMO

VILLAS-BOAS, Julia Dias. **Efeito da acupuntura nas respostas de estresse em equinos: testes laboratorial e a campo.** 2013. 78p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2013.

A Acupuntura é uma técnica milenar da Medicina Tradicional Chinesa utilizada no tratamento e prevenções de doenças, que tem como objetivo auxiliar o corpo retornar ao seu estado de equilíbrio, através da inserção de agulhas de metal em pontos específicos da pele. Nas condições de estresse, o organismo age por meio da ativação e desativação de mecanismo de controle de várias funções para recuperar e manter a homeostase. A exposição repetida ou a reação exagerada e prolongada a situações de estresse estão associadas ao aparecimento de diversas doenças. Desta forma, é fundamental o uso de estratégias que possam prevenir ou minimizar os efeitos deletérios do estresse. A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e o aumento do cortisol sérico são medidas que refletem respectivamente a atividade Sistema Nervoso Autônomo e do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), que são sistemas ativados agudamente em situações de estresse. O presente estudo teve como objetivo padronizar um modelo experimental de estresse agudo de sobressalto específico para equinos e avaliar se acupuntura pode alterar as respostas de estresse, através da utilização de modelos de estresse (teste do sobressalto e reprise de adestramento). No experimento 1, equinos previamente divididos em grupos: G1: Controle, G2: Acupuntura em não-pontos; G3: Acupuntura nos pontos VG1, C7, VG20 e B52 foram submetidos ao teste de sobressalto (abertura abrupta de um guarda-chuva) e analisados a VFC (através do uso do frequencímetro cardíaco Polar Equine™), o cortisol sérico e o comportamento através do teste de reatividade. No experimento 2, a performance na reprise de adestramento, o cortisol sérico e a VFC foram avaliadas em cavalos submetidos previamente a acupuntura nos pontos VG1, C7, VG20 e B52. O teste de sobressalto promoveu aumento significativo da razão LF/HF medida que reflete aumento do balanço simpático em relação ao parassimpático e uma significativa resposta comportamental, embora não tenha significativamente aumentado os níveis de cortisol. A acupuntura reduziu a razão LF/HF no momento de ativação parassimpática e os níveis de cortisol 30 minutos após o estresse sem alterar a resposta de reatividade. O tratamento em não pontos não apresentou nenhum efeito sobre os parâmetros estudados. A reprise de adestramento promoveu aumento dos níveis de cortisol após 30 minutos. Acupuntura reduziu significativamente a razão LF/HF, no entanto, não teve efeito sobre os níveis de cortisol e sobre o desempenho avaliado pelos juízes e cavaleiros. A análise dos dados demonstram que os modelos utilizados foram eficazes para o estudo das respostas de estresse em equinos e podem ser utilizados em estudos futuros para avaliar estratégias anti-estresse. Além disso, podemos concluir que a acupuntura pode ser considerada benéfica na redução dos níveis de estresse em cavalos atletas, devido principalmente sua ação de potencializador do sistema vagal.

Palavras-chave: bem – estar animal, cortisol, variabilidade da frequência cardíaca, comportamento, esporte

ABSTRACT

VILLAS-BOAS, Julia Dias. **Effect of acupuncture in stress responses in horses: laboratory and field tests**. 2013. 78p. Dissertation (Master in Veterinary Medicine). Institute of Veterinary, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Acupuncture is an ancient technique of Chinese traditional medicine used in the treatment and prevention of diseases, and aims to help the body return to its balance state, by inserting metal needles at specific points in the skin. Under stress conditions, the body acts through the activation and deactivation mechanisms to restore and maintain homeostasis. The repeated exposure or the prolonged and exaggerated reaction to stress are associated with the onset of various diseases. Thus, it is essential to use strategies that can prevent or minimize the deleterious effects of stress. The heart rate variability (HRV) and the increased serum cortisol respectively reflect the activity of the autonomic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) systems that are activated acutely in stress situations. The present study aimed to standardize an experimental model of acute stress specific to startle horses and evaluate if acupuncture can alter the stress response through the use of stress models (test start and reprise dressage). The present study aimed to evaluate if acupuncture in Dressage horses can alter the stress responses through the use of a laboratory startle test model (sudden umbrella opening) and a test the field: the dressage. In experiment 1, horses previously divided into groups: G1: control, G2: Acupuncture in non-points; G3: Acupuncture points GV1, H7, GV20 and B52 were tested for startle (an abrupt umbrella opening) and analyzed the HRV (through the use of Polar heart rate monitors heart Equine™), the serum cortisol and the behavior through the reactivity test. In experiment 2, performance in dressage, serum cortisol and HRV were evaluated in horses previously undergone acupuncture points GV1, H7, GV20 and B52. The startle test caused a significant increase of LF/HF that reflects the increased of balance sympathetic in relation to the parasympathetic and a significant behavioral response, without increase cortisol levels. The acupuncture reduced LF/HF ratio at the activation parasympathetic time and cortisol levels 30 minutes after the stress without changing the reactivity response. The treatment in no points had no effect on the studied parameters. The dressage promoted increased levels of cortisol after 30 minutes. Acupuncture significantly reduced the LF/HF ratio, however it had no effect on cortisol levels and the performance evaluated by the judges and riders. The data analysis shows that the models used were effective in the study of stress responses in horses and may be used in further studies to evaluate strategies anti-stress. Furthermore, we conclude that acupuncture can be considered in beneficial in reducing stress levels in athletic horses, mainly due to its potentiating action of the vagal system.

Keywords: animal well - being, cortisol, heart rate variability, behavior, sport

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela1: Efeito da acupuntura na reação comportamental (sobressalto) de equinos ao estresse de sobressalto (Teste de Reatividade).....	45
Tabela2: Avaliação técnica de equinos submetidos a reprise de Adestramento pelos juízes oficiais.....	49
Tabela 3: Avaliação do conjunto submetidos a reprise de Adestramento pelos juízes oficiais.....	49
Tabela 4: Avaliação dos cavaleiros.....	50
Figura 1: Modelo da resposta biológica do animal ao estresse.....	10
Figura 2: Esquema de Ativação do sistema SAM e do eixo HHA.....	11
Figura 3: Esquema de campo de visão de equinos.....	26
Figura 4: Foto sequenciada do modelo experimental de estresse agudo em equinos..	27
Figura 5: Fotografias ilustrando a localização dos pontos.....	28
Figura 6: Esquema dos pontos de acupuntura utilizados.....	30
Figura 7: Programa Polar Pro Trainer Equine Edition®.....	32
Figura 8: Gráfico confeccionadopelo programa Polar Pro Trainer 5®.....	32
Figura 9: Tela do programa HRV analysis.....	33
Figura 10: Algoritmo de análise dos dados por meio da Variabilidade da Frequência Cardíaca.....	34
Figura 11: Efeito da acupuntura na VFC, expressa pela razão LF/HF de equinos submetidos ao estresse de agudo de sobressalto.....	39
Figura 12: Efeito da acupuntura na VFC, expressa pela razão LF/HF de equinos submetidos ao teste de sobressaltomomento de ativação parassimpática.....	40
Figura 13: Efeito da acupuntura na VFC, no componente de baixa frequência (LF) de equinos submetidos ao estresse de agudo de sobressalto.....	41
Figura 14: Efeito da acupuntura na VFC, no componente de alta frequência (HF) de equinos submetidos ao estresse de agudo de sobressalto.....	41
Figura 15: Efeito da acupuntura no STDRR (A) e no RMSSD (B) de equinos submetidos ao estresse agudo de sobressalto.....	43
Figura 16: Efeito da acupuntura na Frequência Cardíaca Média de equinos submetidos ao estresse de agudo de sobressalto.....	44

Figura 17: Efeito da acupuntura na concentração de Cortisol Sérico de equinos submetidos ao estresse agudo de sobressalto.....	45
Figura 18: Efeito da acupuntura na concentração de Cortisol Sérico de equinos 30 minutos pós-estresse.....	45
Figura 19: Efeito da acupuntura na reação comportamental de equinos ao estresse agudo de sobressalto (Teste de Reatividade).....	46
Figura 20: Efeito da acupuntura na VFC, expressa pela razão LF/HF de equinos submetidos a reprise de Adestramento.....	47
Figura 21: Efeito da acupuntura na VFC, no componente de baixa frequência (LF) e no componente de alta frequência (HF) de equinos submetidos a reprise de Adestramento....	48
Figura 22: Efeito da acupuntura na concentração de Cortisol Sérico de equinos submetidos a reprise de Adestramento.....	48

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

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;
DCF: Departamento de Ciências Fisiológicas;
EA: Eletroacupuntura;
FC: Frequência Cardíaca;
FFT: Transformada Rápida de Fourier;
HF: Frequência alta;
HHA: Eixo Hipotálamo Hipófise Adrenal;
IRR: Intervalos cardíacos RR;
LF: Frequência baixa
MTC: Medicina Tradicional Chinesa;
NAV: Nodo Átrioventricular;
NA: Noradrenalina;
NP: Grupo tratado com não pontos;
NS: Nodo Sinoatrial;
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	V
AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS	XI
SUMÁRIO	1
1. INTRODUÇÃO	4
1.1. JUSTIFICATIVA	6
1.2. OBJETIVOS	7
2. REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1. ESTRESSE	8
2.1.1. <i>A resposta de estresse</i>	9
2.1.2. FISILOGIA DO ESTRESSE	10
2.1.3. <i>Cortisol como marcador de estresse</i>	13
2.1.4. VARIABILIDADE DA FREQUENCIA CARDÍACA COMO MARCADOR DE ESTRESSE	14
2.2. MODELOS DE ESTRESSE EM EQUINOS	16
2.3. O CAVALO ATLETA, ESTRESSE E A MODALIDADE ADESTRAMENTO	18
2.4. ACUPUNTURA E MEDICINA TRADICIONAL CHINESA	21
2.4.1. <i>Pesquisa científica em Acupuntura</i>	22
2.4.2. <i>Acupuntura em Equinos</i>	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. EXPERIMENTO 1: EFEITO DA ACUPUNTURA NAS RESPOSTAS AO ESTRESSE AGUDO DE SOBRESSALTO EM EQUINOS	25
ANIMAIS	25
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	25
TRATAMENTOS	27
TESTE DE REATIVIDADE	30
COLETAS DE SANGUE	31
USO DE FREQUENCÍMETROS	31

ANÁLISE DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	31
ANÁLISE DO CORTISOL	34
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	35
3.2. EXPERIMENTO 2: EFEITO DA ACUPUNTURA NO ESTRESSE EM EQUINOS SUBMETIDOS A REPRISE	
DE ADESTRAMENTO: TESTE A CAMPO	36
ANIMAIS	36
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	36
DESENHO EXPERIMENTAL:	37
TRATAMENTOS	37
REPRISE DE ADESTRAMENTO	37
ANÁLISE DO CORTISOL E DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	37
AVALIAÇÃO DOS JUÍZES	38
AVALIAÇÃO DOS CAVALEIROS	38
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
4. RESULTADOS	39
4.1. EXPERIMENTO 1: EFEITO DA ACUPUNTURA NAS RESPOSTAS AO ESTRESSE AGUDO DE	
SOBRESSALTO EM EQUINOS	39
<i>4.1.1. Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca</i>	39
4.1.2. ANÁLISE DO CORTISOL SÉRICO	44
4.1.3. ANÁLISE COMPORTAMENTAL: TESTE DE REATIVIDADE	45
4.2. EXPERIMENTO 2: EFEITO DA ACUPUNTURA NO ESTRESSE EM EQUINOS SUBMETIDOS A REPRISE	
DE ADESTRAMENTO: TESTE A CAMPO	47
<i>4.2.1. Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca</i>	47
4.2.2. ANÁLISE DOS NÍVEIS DE CORTISOL SÉRICO	48
4.2.3. AVALIAÇÃO DOS JUÍZES	49
4.2.4. AVALIAÇÃO DOS CAVALEIROS	50
4.2.5. ANÁLISE DE CORRELAÇÃO	50
5. DISCUSSÃO	51
5.1. EXPERIMENTO 1: EFEITO DA ACUPUNTURA NAS RESPOSTAS AO ESTRESSE AGUDO DE	
SOBRESSALTO EM EQUINOS	51
5.1.1. O MODELO EXPERIMENTAL	51
5.1.2. O EFEITO DA ACUPUNTURA NA ALTERAÇÕES DA VFC INDUZIDAS PELO ESTRESSE DE SOBRESSALTO	54
5.1.3. O EFEITO DA ACUPUNTURA NO ESTRESSE ATRAVÉS DA ANÁLISE DO CORTISOL	57

5.1.4. O EFEITO DA ACUPUNTURA NO ESTRESSE ATRAVÉS DO TESTE DE REATIVIDADE	58
5.2. EXPERIMENTO 2: EFEITO DA ACUPUNTURA NO ESTRESSE EM EQUINOS SUBMETIDOS A REPRIS DE ADESTRAMENTO: TESTE A CAMPO	58
5.2.1. A REPRIS DE ADESTRAMENTO COMO MODELO DE ESTRESSE	58
5.2.2. ACUPUNTURA NA REPRIS DE ADESTRAMENTO	59
5.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
6. CONCLUSÃO	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. ANEXOS	73
8.1. FICHA DE CONTROLE INDIVIDUAL DO EXPERIMENTO 1.	73
8.2. FICHA DE CONTROLE INDIVIDUAL DO EXPERIMENTO 2.	74
8.3. ESQUEMA DO PICADEIRO DE ADESTRAMENTO	75
8.4. MODELO DO QUESTIONÁRIO DISTRIBUÍDO PARA OS CAVALEIROS APÓS A REPRIS.	76
8.5. FICHA AVALIAÇÃO DOS JUÍZES OFICIAIS (CBH)	77

1. INTRODUÇÃO

Todos os animais estão sujeitos a diferentes tipos de estressores e podem padecer das doenças relacionadas ao estresse. O cavalo atleta é frequentemente sujeito desde muito jovem a estágios iniciais de treinamento, o que o leva a apresentar elevada sensibilidade a diferentes estressores, sejam estes ambientais ou relacionados aos exercícios propriamente ditos. Esta alta sensibilidade ao estresse está relacionada à maior incidência de doenças infecciosas, úlceras gástricas, alterações comportamentais (desenvolvimento de estereotípias, mordedura, agressividade, depressão, perda de apetite) e queda de desempenho.

O estresse é o estado gerado pela percepção de estímulos que provocam excitação emocional e perturbam a homeostasia. Este estado dispara um processo de adaptação, produzindo diversas manifestações sistêmicas, como distúrbios fisiológicos e emocionais.

Os níveis de estresse podem ser avaliados através da mensuração de parâmetros fisiológicos (autônômicos e neuroendócrinos) 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 Autônomo (SNA) em indivíduos submetidos a estímulos potencialmente desafiadores. As alterações comportamentais são estudadas, preferencialmente, em conjunto com as alterações neuroendócrinas.

O controle dos níveis de estresse pode ser fundamental para um bom desempenho do cavalo atleta. Desta forma, cada vez mais tem se buscado 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 produzem diversos efeitos colaterais indesejados. No cavalo atleta o uso de medicamentos deve ser avaliado com maior cautela ainda porque pode ser considerado doping. Vale lembrar que a administração de qualquer substância em cavalos que possa modificar sua performance durante uma prova desportiva é considerada doping.

Dente as modalidades hípcas, o Adestramento é a modalidade que mais exige que o animal esteja tranquilo e relaxado. Essa prova consiste essencialmente de figuras ou movimentos exigidos a passo, trote e galope, que segundo o Art. 401 do Regulamento da Confederação Brasileira de Hipismo (2011), tem como princípio, o cavalo se mostrar

calmo, elástico, descontraído, flexível, confiante, atento e impulsionado de modo a ter um perfeito entendimento com seu cavaleiro e, conseqüentemente, um perfeito desempenho em pista, executando os movimentos e figuras com precisão, cadência, regularidade e leveza. O estresse pode afetar o desempenho desses atletas, pela possibilidade destes apresentarem-se tensos e desconfiados, desatentos, terem algum tipo de hesitação ou resistência aos comandos, além das alterações neuroendócrinas maléficas ao animal.

A Acupuntura, prática fundamental da Medicina Tradicional Chinesa, é uma técnica milenar utilizada no tratamento e prevenções de doenças, tendo como objetivo auxiliar o corpo retornar ao seu estado de equilíbrio, através da inserção de agulhas especiais em pontos específicos da pele. 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 e ser permitida pela Federação Equestre Internacional (FEI) em competições.

O presente estudo teve como objetivo avaliar se um tratamento único por acupuntura pode alterar as respostas autonômicas (variabilidade da frequência cardíaca), endócrinas (níveis cortisol sérico) e comportamentais induzidas pelo estresse agudo de sobressalto (abertura abrupta de um guarda-chuva) em equinos. Além disso, também foram avaliados o desempenho, as respostas autonômicas (variabilidade da frequência cardíaca) e endócrinas (níveis cortisol sérico) de equinos de elite em provas na modalidade hípica de Adestramento.

1.1. JUSTIFICATIVA

O cavalo atleta é constantemente submetido a situações de estresse. Frente a necessidade de melhorar a qualidade de vida, em vista do bem-estar animal e consequentemente melhorar o desempenho atlético é fundamental o desenvolvimento de estratégias para minimizar os efeitos do estresse, principalmente em cavalos de Adestramento. Desta forma, estudos sobre os efeitos da acupuntura e sua aplicação clínica no tratamento e prevenção do estresse são necessários, principalmente porque existem poucos estudos a respeito dos benefícios desta terapia no tratamento ou prevenção de alterações decorrentes do estresse.

Apesar da grande importância do estresse para a medicina veterinária, poucos modelos de estresse podem ser utilizados em equinos. Dessa forma, o presente estudo também propõe um modelo de estresse de sobressalto para equinos descrevendo as respostas autonômicas (Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC)), comportamentais (tempo de reatividade) e endócrinas (cortisol sérico).

1.2. OBJETIVOS

Geral

Verificar o efeito da acupuntura nas respostas de estresse de equinos atletas.

Específicos

- Padronizar um modelo experimental de estresse de sobressalto específico para equinos.
- Verificar o efeito da acupuntura nas respostas de equinos atletas da modalidade Adestramento submetidos a um modelo experimental de estresse (teste do guarda-chuva adaptado), através da análise das alterações autonômicas (variabilidade da frequência cardíaca), endócrinas (cortisol séricos) e comportamentais (teste da reatividade).
- Avaliar o efeito da acupuntura nas respostas de equinos atletas submetidos a um teste a campo (reprise de adestramento), através da análise das alterações autonômicas (variabilidade da frequência cardíaca), endócrinas (cortisol séricos) e da performance atlética (avaliação dos juízes).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estresse

Segundo Selye (1936), estresse é situação gerada por um desafio a qual um organismo está submetido. O termo estresse denota o estado gerado pela percepção de estímulos que provocam excitação emocional e, ao perturbarem a homeostase, disparam um processo de adaptação caracterizado, entre outras alterações, pela ativação do Sistema Nervoso Simpático (aumento de secreção de adrenalina) produzindo diversas manifestações sistêmicas, com distúrbios fisiológicos e emocionais (MARGIS, 2003).

A resposta a um estímulo estressor é fundamental para homeostase de um ser vivo e sua sobrevivência. Nas condições de estresse, o organismo reage por meio da ativação e desativação de mecanismo de controle de várias funções para recuperar e manter a homeostase. No entanto, essas respostas podem ser insuficientes para restabelecer ou manter a homeostase ou podem ser exageradas, representando risco de doenças. Portanto, o estresse pode ser definido como a soma de respostas físicas e mentais causadas por determinados estímulos externos e que permitem ao indivíduo superar determinadas exigências do meio-ambiente (FRANCI, 2005).

O termo estresse tem sido usado como as reações que a acompanham situações de ameaça ou desafio. No entanto, nem todas as reações de estresse são negativas. Uma certa quantidade de estresse é realmente necessária para a sobrevivência. A reação de estresse maximiza o gasto de energia que ajuda a preparar o corpo para atender a uma situação ameaçadora ou desafiadora e que o indivíduo tende a mobilizar um grande esforço a fim de lidar com o evento. No entanto, enquanto uma certa quantidade de estresse é necessário para a sobrevivência, o estresse prolongado pode afetar adversamente a saúde (BERNARD & KRUPAT, 1994).

Em situações de estresse, ocorre a ativação de duas principais vias: o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), através do aumento da produção de cortisol e o sistema nervoso simpático, através da liberação de catecolaminas (Noradrenalina/Adrenalina).

A desregulação de qualquer um desses sistemas de estresse pode levar a distúrbios fisiológicos de vários outros sistemas, incluindo os sistemas imunológico e cardio vascular, função metabólica e comportamento, levando a uma má adaptação da resposta ao estresse (MARQUES et al, 2010). Distúrbios de comportamento e estresse foram apresentados

como uma das principais causas de doenças, lesões e morte em equinos (DEVRIES et al, 2007). O aumento da incidência de doenças em animais com estresse pode ser atribuído a supressão de seu sistema imunológico. Um dos exemplos mais citados é o aumento da incidência de doenças respiratórias em cavalos transportados, que é atribuído a uma supressão do sistema imune causado pelo estresse de transporte (BLECHA, 2000). O estresse fisiológico e transporte são citados como fatores de risco para o surgimento de úlceras gastroduodenais em equinos, sendo que a prevalência e a gravidade destas são maiores em animais de alto desempenho.

O início da resposta ao estresse pode ser causado por estímulos predominantemente físicos ou predominantemente psicológicos (KEELING e JENSEN, 2002). Independente da causa, as respostas de estresse são bem descritas em equinos e inclui elevadas frequências respiratória e cardíaca, aumento da temperatura corporal e da pressão arterial e de expressão facial típica entre muitos outros sinais comportamentais específicas (DOBROMYLSKYJ et al., 2000; SCHATZMANN, 2000;RIETMANN et al., 2004).

2.1.1. A resposta de estresse

Moberg (2000) propõem um modelo para compreensão do estresse em toda espécie animal, seja nos seres humanos ou em animais.O modelo de estresse animal desenvolvido (Figura 1) sugere uma resposta biológica ao estresse a partir de três estágios gerais:

- 1º) O reconhecimento de um estímulo estressante
- 2º) A defesa biológica contra o estímulo estressante
- 3º) As consequências da resposta de estresse

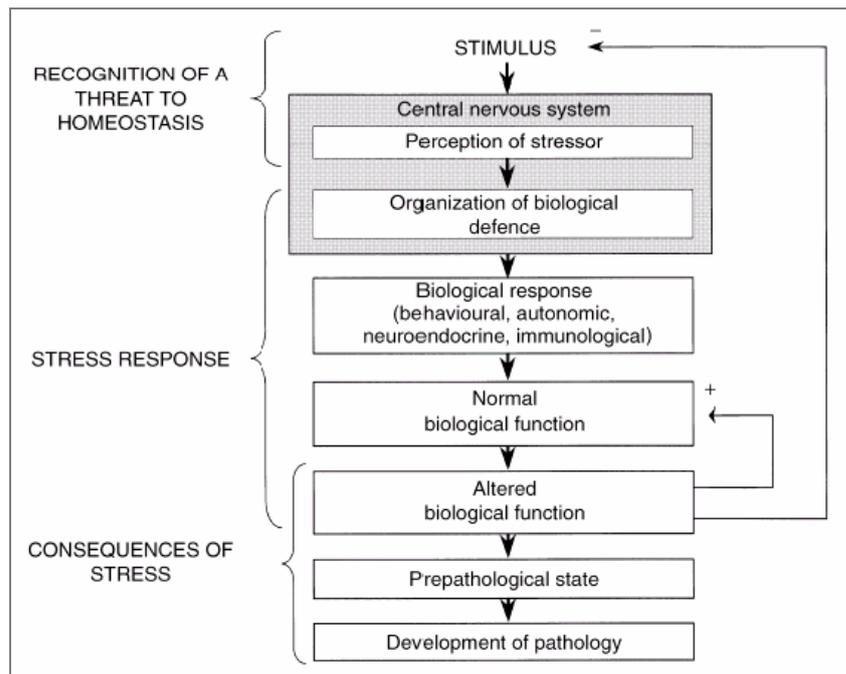


Figura 1: Modelo da resposta biológica do animal ao estresse (MORBEG, 2000)

A resposta ao estresse começa com a percepção de uma ameaça potencial (estímulo estressante) a homeostase pelo SNC. Uma vez que o SNC percebe uma ameaça, o organismo desenvolve uma resposta biológica ou defesa que consiste numa combinação de três respostas gerais de defesas biológicas:

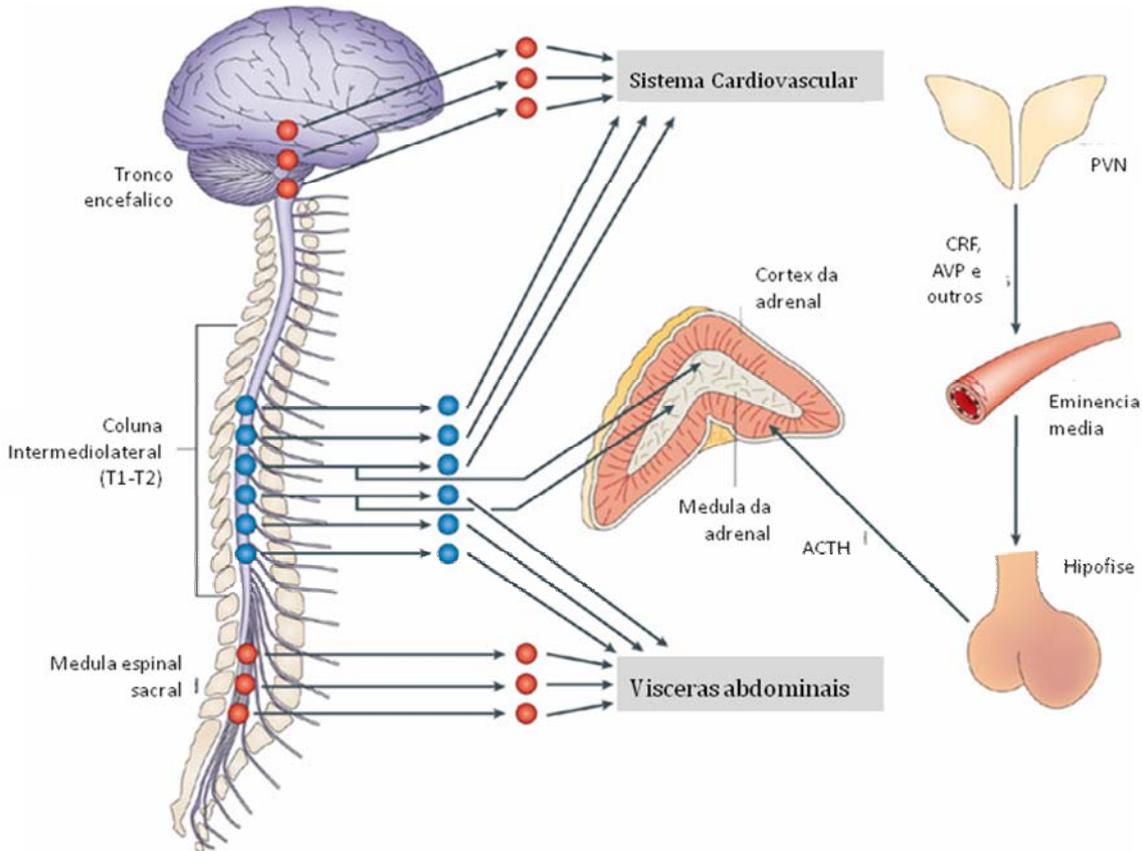
- Resposta comportamental
- Resposta do sistema nervoso autônomo
- Resposta do sistema neuro-endócrino

Este conjunto de respostas do organismo causa mudanças biológicas significantes no animal para aliviar a ameaça percebida. A intensidade da resposta é o que determina se o animal está sofrendo de estresse ou é meramente experimentado um episódio breve em sua vida sem nenhum impacto significativo ao seu bem-estar.

2.1.2. Fisiologia do estresse

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(Figura 2). 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 (ULRICH-LAI & HERMAN, 2009).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 2: 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 azuis) 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 círculos vermelho), 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).

O SNC é ativado, sobretudo por centros localizados na medula espinhal, no tronco cerebral e no hipotálamo. Porções do córtex cerebral, especialmente do córtex límbico, podem transmitir impulsos para os centros inferiores e, desta maneira, influenciar o controle autonômico. Os sinais aferentes autonômicos são transmitidos através do sistema nervoso simpático e do sistema nervoso parassimpático. A estimulação dos nervos simpáticos das medulas supra-renais, durante uma situação de estresse, faz com que grandes quantidades de adrenalina (epinefrina) e noradrenalina sejam liberadas na circulação sanguínea, através da qual são liberadas para todo o corpo, afetando o sistema cardiovascular, o sistema gastro-intestinal, as glândulas exócrinas e a medula adrenal (GUYTON, 1997). Como resultado, promovem alterações na frequência cardíaca, pressão arterial, atividade gastrointestinal, excreção de urina, sudorese e concentração de glicose sanguínea.

A resposta neuroendócrina ao estresse mais conhecida e consistente, é a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), iniciando pela com a liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) pelo hipotálamo, e posteriormente liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise, para resultar na secreção de hormônios glicocorticoides da glândula adrenal (GUYTON, 1997). 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, equinos 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).

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).

2.1.3. Cortisol como marcador de estresse

O aumento do cortisol sérico é o principal marcador de estresse em diversas espécies e também em equinos (ALEXANDER et al., 1988; MARTINEZ et al, 1988; MAL et al, 1991; DICKSON, 1996; TEIXEIRA e PADUA, 2000;SCHMIDT et al. 2009).

A secreção de cortisol obedece a um padrão de ritmo circadiano endógeno. Nos animais de hábitos diurnos, como os equinos, as concentrações apresentam valores mais elevados no período da manhã entre 6:00h e 10:00h, decrescendo ao longo do dia (McCue, 2002). As variações circadianas do cortisol podem ser afetadas por vários fatores como exercício, padrões de sono, tipo de atividade a que o indivíduo é submetido e ambientes estressantes (Pell e Mc Greevy, 1999), porém estas variações não se alteram em decorrência de raça, idade, sexo ou prenhez (DOUGLAS, 2000).

O valor de referência do cortisol sérico em equinos é de 1,30 a 2,93 mg/dL (Kaneko et al., 1997). Em estudo anterior, Covalsky et al. (1992) demonstraram que os valores de cortisol em repouso e logo após o exercício em cavalos de salto variaram entre 154 a 287 nmol/l. Em estudo com cavalos de corrida, os valores encontrados por Angeli e colaboradores (2008) tiveram média de 114 nmol/l em repouso e após o exercício tiveram média de 160 nmol/l).

O cortisol é alterado em resposta ao exercício físico, sendo o principal hormônio utilizado em estudos com exercício. O aumento normalmente é de duas a três vezes, retornando ao normal cerca de quatro horas após uma prova de esforço agudo (ANGELI,

2004). Luna (1993) demonstrou que os níveis de cortisol plasmático foram maiores nos exercícios de baixa intensidade e longa duração do que nos de alta intensidade e curta duração, sugerindo que a duração mais que a intensidade do estímulo promoveu uma resposta ao estresse mais intensa.

Cayado e colaboradores (2006) observaram que cavalos da Modalidade adestramento apresentaram baixos níveis de cortisol basal quando comparado a cavalos não envolvidos em competição e apresentaram um aumento após a competição. Por outro lado, cavalos de salto não apresentavam alterações no cortisol após competição. O autor sugere que cavalos de Adestramento são mais sensíveis ao estresse, correspondendo ao conceito do estresse psicológico nessa modalidade.

2.1.4. Variabilidade da Frequência Cardíaca como marcador de estresse

A Variabilidade da Frequência Cardíaca (VFC) tem sido utilizada com sucesso como uma medida da regulação autonômica da atividade cardíaca para avaliar o estresse e o bem estar de animais em diversas circunstâncias (BORELL et al, 2007). A VFC é resultado das influências antagônicas do sistema nervoso simpático e parassimpático sobre o nódulo sinoatrial. Deste modo, reflete o equilíbrio existente de tônus simpático e parassimpático (vagal).

Dentre as técnicas utilizadas para avaliação do Sistema Nervoso Autônomo, a VFC tem emergido como uma medida simples e não invasiva dos impulsos autonômicos, representando um dos mais promissores marcadores quantitativos do balanço autonômico. Mudanças nos padrões da VFC fornecem um indicador de comprometimento da homeostase/equilíbrio (VANDERLEI et al, 2009).

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 o núcleos reticulares bulbares, o hipotálamo e as áreas neocorticais e paleocorticais, participam também na regulação da atividade cardiovascular. Sendo assim, o estímulo elétrico

produzido no NS recebe influência de diversos fatores que vão resultar na variabilidade de pulsos cardíacos (VON BORELL et al., 2007).

Para análise da VFC, podem ser utilizados índices obtidos por meio de métodos lineares no domínio do tempo e no domínio da frequência.

Para a análise da VFC no domínio do tempo, assim denominada por expressar os resultados em unidade de tempo (milissegundos), mede-se cada intervalo RR durante um determinado intervalo de tempo e, a partir daí, com base em métodos estatísticos ou geométricos (média, desvio padrão e índices derivados do histograma ou do mapa de coordenadas cartesianas dos intervalos RR), calculam-se os índices tradutores de flutuações na duração dos ciclos cardíacos (HOSHI, 2009).

Os índices estatísticos obtidos no domínio do tempo são (HOSHI, 2009; VANDERLEI, 2009):

a) SDRR - Representa o desvio padrão das médias dos intervalos RR normais, a cada 5 minutos, em um intervalo de tempo, expresso em ms;

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

Outro método linear é o domínio da frequência. Esta análise decompõe a VFC em componentes oscilatórios fundamentais, sendo que os principais são (HOSHI, 2009; VANDERLEI, 2009):

a) Componente de alta frequência (*High Frequency* - HF), com variação de 0,15 a 0,4Hz, que corresponde à modulação respiratória e é um indicador da atuação do nervo vago sobre o coração;

b) Componente de baixa frequência (*Low Frequency* - LF), com variação entre 0,04 e 0,15Hz, que é decorrente da ação conjunta dos componentes vagal e simpático sobre o coração, com predominância do simpático;

c) Componentes de muito baixa frequência (*Very Low Frequency* - VLF) e ultrabaixa frequência (*Ultra Low Frequency* - ULF) - Índices menos utilizados cuja explicação fisiológica não está bem estabelecida e parece estar relacionada ao sistema renina-angiotensina-aldosterona, à termorregulação e ao tônus vasomotor periférico. A relação LF/HF reflete as alterações absolutas e relativas entre os componentes simpático e parassimpático do SNA, caracterizando o balanço simpato-vagal sobre o coração.

Os limites que definem os componentes frequenciais variam entre as espécies. Em equinos, a VFC pode ser dividida em dois componentes de frequência principais: a baixa

(LF) e alta (HF) frequência. No presente estudo utilizamos os limites de 0,04 a 0,16Hz para LF e de 0,16 a 0,4 Hz para HF que é recomendado pelo programa HRV analysis (Manual HRV Analysis) A escolha dos limites das bandas frequenciais é de acordo com a variação da FC esperada durante o experimento. Para variações mais altas o limite de LF deve ser maior. Outros autores utilizam limites das bandas de frequência diferentes: LF: 0,01 a 0,07 e HF: 0,07 a 0,50 Hz (MATSUURA et al, 2010); LF: 0,04 – 0,15 e HF: 0,15 a 0,4(VON BORELL et al., 2007; LF: 0, 01 a 0,15 e HF: 0,15 a 0,5 (RIETMANN et al, 2004).

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 (VON BORELL et al., 2007). Desta forma, aVFC pode avaliar alterações do sistema nervoso autônomo (SNA) em diferentes níveis de excitação, sendo esta uma medida importante para quantificar o equilíbrio simpato-vagal, que permite uma avaliação mais precisa das respostas ao estresse mental durante o exercício de baixa intensidade de equinos (RIETMANN et al, 2004).

A análise da VFC tem sido usada como indicador de estresse agudo e crônico (BORELL et al, 2007).Visser e colaboradores (2001) demonstraram que o estresse provocado através do modelo experimental de exposição a um objeto novo (“Teste do Guarda-Chuva”) induz um estado fisiológico caracterizado por um aumento significativo da média da frequência cardíaca (53.7 ± 1.4 para 159.5 ± 4.4 bpm) e alterações significativas na VFC (SDRR = $131,1 \pm 9,5$ para $91,4 \pm 7.0$ ms, que indica ativação simpática e rMSSD = $46,3 \pm 4,8$ para $15,8 \pm 1,9$ ms, que indica incremento da ativação vagal).

Van Breda (2010) buscando estudar o nível de estresse em uma técnica de adestramento em equinos e observou os seguintes valores: basal: LF = $87,86 \pm 9,48$; HF = $12,14 \pm 10,56$; LF/HF = $1,8 \pm 0,7$ e 30 a 45 minutos pós-exercício: LF = $98,83 \pm 12,1$; HF = $23,09 \pm 9,1$; LF/HF = $11,07 \pm 6,4$.

2.2. Modelos de estresse em equinos

Muitos estímulos têm sido utilizados para se estudar as respostas de estresse em equinos, como a pressão física, estímulo sonoro (chocalho de moedas num metal) (HOLLAND, 1996) ou estímulos visuais (REDONDO et al, 2009). O estresse provocado pelo exposição a um objeto novo (“Teste do Guarda-Chuva”) vêm sendo utilizado por

diversos autores (VISSER et al., 2002; NICOL et al., 2005; GÓRECKA et al., 2007; CHRISTENSEN et al., 2010).

Visser e colaboradores (2002), objetivando estudar os efeitos na FC e na VFC de equinos em situações desafiadoras, utilizaram um modelo, no qual um guarda-chuva foi baixado de uma altura de 6 metros. O animal, após aguardar num box de partida por 2 minutos, era colocado numa arena. Após 2 minutos, o guarda-chuva era baixado do teto, e permanecia por mais 5 minutos para o animal investigar o objeto. Neste caso a reação de exploração ou aversão ao objeto novo foi avaliada.

Em outro estudo, cavalos foram levados em pares para um estábulo grande (4,42x 5,03m). Após a adaptação de um minuto um guarda-chuva foi levantado por de baixo da porta do estábulo e aberto lentamente por uma pessoa escondida atrás da porta. O guarda-chuva foi girado lentamente durante um período de 120s. Os animais apresentaram principalmente uma resposta investigativa com comportamentos demastigar e/ou lambe, trote ou galope para a frente, ficar alerta com a cabeça e pescoço levantado, os olhos arregalados e orelhas em pé ou em movimento, olhar ou cheirar o objeto novo (NICOL et al., 2005).

Em modelo utilizado por Górecka e colaboradores (2007), um guarda-chuva foi aberto por um experimentador que permaneceu imóvel por 5 minutos enquanto cada cavalo ficava livre num picadeiro. O cavalo teve a oportunidade de reagir livremente, sendo observada a reação de sobressalto e resposta de fuga. Neste período o cavalo pode abordar voluntariamente, farejar e/ou tocar o guarda-chuva.

Os estudos citados utilizaram a abertura do guarda-chuva como um modelo de novidade. Neste modelo são avaliadas as reações de fuga e reações de exploração, no entanto as reações de sobressalto observadas são razoavelmente pequenas, uma vez que o guarda chuva é aberto lentamente. Alguns modelos tentam mimetizar modelos de sobressalto semelhante aos utilizados em roedores, onde a resposta de sobressalto é bem caracterizada e bem estudada (KOCH, 1999). Redondo e colaboradores (2009) utilizaram modelo experimental no qual uma imagem de cabeça de tigre surgia abruptamente de uma caixa posicionada no centro de um picadeiro. O aparecimento da imagem foi realizada por controle remoto quando os animais estavam atentos à caixa. Neste caso foram observados principalmente resposta de sobressalto.

2.3. O cavalo atleta, estresse e a modalidade adestramento

Há inúmeros fatores que permeiam a vida de um animal de competição servindo como fontes estressoras. Estes animais estão, invariavelmente, submetidos ao confinamento sendo que, em seu ambiente natural, os equinos passam 60% de seu tempo pastando, em contraste com os 10% que passam recebendo alimentação pré-determinada uma vez confinados. Isso aliado à restrição do convívio social, intensidade de atividade física e baixa ingestão de volumoso são fatores de estresse importantes para esses animais.(HOUPY, 1993; MCGREEVY, 2004). Condições ambientais adversas, transporte por longas distâncias, descanso insuficiente entre eventos ou após longo período de viagem, níveis elevados de estresses com os tratadores ou cavaleiros são alguns outros pontos que devem receber atenção redobrada (HOUPY, 1993; MCGREEVY, 2004). Todos esses fatores podem interferir no desempenho de um cavalo atleta e requerem atenção especial (TEIXEIRA, 2002).

Durante a competição, os equinos são submetidos a várias fontes de estresse que podem ter uma influência negativa sobre o desempenho, bem-estar e segurança humana (JORGENSEN, 2010). No entanto, poucas pesquisas têm sido feitas a campo ou durante competições equestres, sendo a maioria dos estudos com animais treinados em laboratório e não com animais de alto padrão (VAN BREDA, 2006).

Cayado e colaboradores (2006) afirmam que competições em diversas modalidades, provocam uma clássica resposta fisiológica de estresse, sugerindo que cavalos envolvidos em competição podem proporcionar um modelo de estresse induzido pelo exercício.No entanto, SCHMIDT (2010) afirmou que embora tenha observado em seu estudo essa clássica resposta (alterações no cortisol, FC e VFC), as competições não foram grandes estressores quando comparados com outros desafios antropogênicos, como o transporte, aos quais esses animais são expostos regularmente.

O adestramento ou dressage (que deriva da palavra francesa dresser, que significa "treinar") é uma das três modalidades olímpicas, regulada pela Federação Equestre Internacional (FEI).

Os preâmbulos do Adestramento remontam à Grécia Antiga, com Xenofonte (historiador e instrutor equestre do século III antes de Cristo). O desabrochar do Adestramento teve como berço a Europa renascentista, mais especificamente a Itália. Mas na forma como o conhecemos hoje, se deve principalmente ao grande mestre francês do princípio do século XVIII, François de la Guerinière, que teve o mérito de aprimorar e

refinar todas as técnicas conhecidas até então. O princípio mais sagrado do Adestramento foi dado por outro grande cavaleiro francês, o general L' Hotte. Corresponde ao enunciado calmo, direito e para frente. o que significa que o animal não deve estar nervoso, andar torto ou rígido de um lado e também não pode prescindir de forte impulsão.

O objetivo geral do Adestramento é auxiliar o cavalo a desenvolver, através de diversos exercícios, a capacidade de executar todos os seus movimentos naturais, tornando-o um animal flexível, calmo, atento ao cavaleiro e, portanto, agradável de se montar. O adestramento tem por objetivo o desenvolvimento harmônico do organismo e dos recursos naturais do cavalo. Visa, então, tomar o cavalo calmo, ágil, desembaraçado e flexível, como também confiante, atento. Essas qualidades, decorrentes do desenvolvimento harmônico colimado no adestramento, manifestam-se pela:franqueza e regularidade das andaduras; harmonia, leveza e facilidade dos movimentos; leveza do antemão e engajamento dos posteriores; submissão ao bocado, sem opor nenhuma tensão ou resistência (Regulamento CBH, 2011).

A reprise de adestramento é uma prova da modalidade hípica regulamentada pela Confederação Brasileira de Hipismo (CBH) que consiste essencialmente de figuras ou movimentos exigidos a passo, trote e galope (reunidos, médios e estendidos),os quais são avaliadas por juízes.

De acordo com o regulamento da CBH (2011), os juízes avaliam a qualidade técnica e a do conjunto (cavalo-cavaleiro).

Avaliação da Técnica

O grau de execução da Parte Técnica depende somente da qualidade da apresentação dos movimentos obrigatórios da reprise. Ou seja, consistiu na avaliação individual da qualidade de cada figura e movimento executados na reprise.

Alto: o cavalo deve conservar-se atento, engajado, imóvel e direito, quadrado, com seu peso igualmente distribuído sobre seus quatro membros. O pescoço sustentado, a nuca como o ponto mais alto e o chanfro ligeiramente para a frente da vertical. Conservando-se "na mão" e mantendo um contato leve e macio com a mão do cavaleiro, o cavalo deve mascar tranqüilamente o bocado e estar pronto para mover-se para frente à menor indicação do cavaleiro.

Passo: é uma andadura marchada a quatro tempos bem marcados com intervalos iguais entre cada batida. Esta regularidade combinada com total descontração deve ser mantida

durante todos os movimentos ao passo. São reconhecidos os seguintes passos: Passo Reunido, Passo Médio, Passo Alongado e Passo Livre. Deverá sempre haver uma nítida diferença na atitude e no transpistamento, nestas variações.

Trote: é uma andadura a dois tempos sobre bípodes diagonais alternados (anterior esquerdo e posterior direito e vice-versa), separados por um momento de suspensão.

O trote deve ser mostrado com passadas francas, ativas e regulares. A qualidade do trote é julgada pela impressão geral, isto é a regularidade e a elasticidade das passadas, a cadência e a impulsão, tanto na reunião como na extensão. Esta qualidade é oriunda de um dorso flexível e posteriores bem engajados, e pela aptidão de conservar um mesmo ritmo e um equilíbrio natural, em todas as variações do trote.

São reconhecidos os seguintes trotes: Trote Reunido, Trote de Trabalho, Trote Médio, Trote Alongado e Alongar o Trote.

Galope: é uma andadura a "três tempos" na qual no galope à direita por exemplo, as batidas se sucedem na seguinte ordem: posterior esquerdo, diagonal esquerda (anterior esquerdo e posterior direito, deslocando-se simultaneamente), anterior direito, seguidos por um tempo de suspensão com os quatro membros no ar antes do lance seguinte. O galope, sempre com lances leves, cadenciados e regulares, deve ser iniciado sem hesitação. A qualidade do galope é julgada pela impressão geral, ou seja, a regularidade e a leveza da andadura, a tendência de elevar a atitude e a cadência, oriunda da aceitação da embocadura, com uma nuca flexível, do engajamento dos posteriores, com uma ação enérgica dos jarretes e, pela habilidade para manter o mesmo ritmo e um equilíbrio natural, mesmo depois da transição de um galope para outro. O cavalo deve permanecer, sempre, direito sobre as linhas retas e corretamente encurvado nas linhas curvas. Os seguintes galopes são reconhecidos: Galope Reunido, Galope de Trabalho, Galope Médio, Galope Alongado e Alongar o Galope.

Avaliação do Conjunto (cavalo/cavaleiro)

É a parte artística, onde ritmo, energia, elasticidade e harmonia entre Cavalo e Cavaleiro são considerados. Todas as notas artísticas são dependentes da qualidade da execução técnica.

Andaduras: adequada harmonia que um cavalo demonstra quando se move com acentuada regularidade, franqueza e equilíbrio. A cadência deve ser mantida em todos os

diferentes exercícios ao trote e ao galope e, em todas as variações destas andaduras. A regularidade das andaduras é fundamental para o Adestramento.

Impulsão é o termo usado para descrever a transmissão de uma atenta e enérgica, embora controlada, energia propulsiva produzida no movimento atlético do cavalo. Sua expressão máxima só pode ser demonstrada através de um dorso macio e flexível guiado por um suave contato com a mão do cavaleiro.

Submissão não significa subordinação, mas uma obediência que revela sua presença por uma atenção constante, boa vontade e confiança do cavalo assim como pela harmonia, leveza e facilidade que ele demonstra na execução de diferentes movimentos.

Cavaleiro: deve estar bem equilibrado, elástico, sentado fundo no centro da sela e ligado suavemente ao ritmo do cavalo com sua cintura e quadris flexíveis, coxas e pernas fixas e bem descidas. Todos os movimentos devem ser obtidos com ajudas imperceptíveis e sem um esforço aparente do cavaleiro. A eficiência das ajudas do cavaleiro determina o cumprimento preciso dos movimentos exigidos nas reprises. Deverá haver sempre a impressão de uma harmoniosa cooperação entre cavalo e cavaleiro.

2.4. Acupuntura e Medicina Tradicional Chinesa

A acupuntura é uma técnica terapêutica da Medicina Tradicional Chinesa, que ao longo dos anos vem sendo muito difundida no Ocidente. A acupuntura tem desempenhado um papel importante na civilização chinesa desde os tempos antigos, quando chineses além de utilizar essa técnica em humanos, também a praticavam em seus animais, inicialmente em cavalos, que eram muito importantes para a agricultura e para a guerra (TORRO, 1997).

O termo acupuntura é derivado dos radicais latinos “acus e pungere”, que significam agulha e puncionar respectivamente. É uma técnica que busca o tratamento e cura das enfermidades pela aplicação de estímulos através da pele, com a inserção de agulhas em pontos específicos (WEN, 1989; JAGGAR, 1992; SCHOEN, 2006). Os locais ou regiões anatômicas onde se realizam as punções com agulhas são conhecidos como “pontos de acupuntura” ou “acupontos”.

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

Segundo a Medicina Tradicional Chinesa, a inervação da pele recebe e envia os impulsos oriundos de diferentes regiões do corpo. Quando um órgão se encontra enfermo, gera-se um estímulo doloroso nos terminais nervosos sobre a pele. Trata-se de um distúrbio, que torna o local afetado da pele doloroso ao ser pressionado. Este estímulo pode ser sentido ao longo da pele através dos meridianos onde se localizam a maioria dos pontos de acupuntura. Quando uma agulha fina é colocada no ponto sensível e as fibras nervosas são estimuladas. O impulso vai para o tronco encefálico e de lá retorna para o órgão doente, restabelecendo assim o seu equilíbrio normal (MANM, 1971).

Pela visão da Medicina Tradicional Chinesa, a energia flui através do organismo ao longo dos canais específicos ou meridianos. Estes meridianos fazem a comunicação entre órgãos e extremidades, e através deles que as funções fisiológicas do organismo são reguladas e o equilíbrio é mantido. Ao longo de cada meridiano existem pontos específicos onde as agulhas são inseridas (MACIOCIA, 1996).

O terapeuta da medicina tradicional chinesa se empenha em ver o paciente e a doença nos termos da relação mútua que apresentam e, então auxilia o corpo a retornar ao estado de equilíbrio (LIMEHOUSE; TAYLOR-LIMEHOUSE, 2006).

Pela visão da MTC, o estresse causado por viagens, dieta, manejo e dor podem levar ao aparecimento de sentimentos como preocupação, raiva, depressão e medo que são identificados por pessoas que convivem com estes animais. A preocupação e a ansiedade deprimem o baço-pâncreas e o Qi do pulmão, a irritabilidade pode criar a estagnação do Qi do fígado bem como a deficiência de sangue do fígado e o medo deprime o Qi do Rim (HENNEMAN, 2001). Portanto, o estresse leva ao desequilíbrio do organismo.

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). Um dos muitos usos clínicos da acupuntura é o tratamento do estresse.

2.4.1. Pesquisa científica em Acupuntura

Muitos estudos demonstraram os efeitos da acupuntura no estresse, como a ação inibitória da eletroestimulação do ponto 36E sobre a hipersecreção de corticosterona induzidos pelo estresse de imobilização em coelhos (LIAO, 1979). Em indivíduos saudáveis, a acupuntura no mesmo ponto, significativamente reduz as elevações na pressão

arterial induzida pelo estresse (MIDDLEKAUFFET *et al.*, 2001). A eletroacupuntura nos pontos PC6 e C3 reduziu os níveis de adrenalina e noradrenalina, a frequência cardíaca e a pressão arterial em ratos submetidos ao estresse de imobilização (YANG *et al.*, 2002).

Guimarães *et al.* (1997) avaliaram o efeito da acupuntura nos acupontos 6BP, 36E, 17VC, 6PC, 20VG 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, sugerindo 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.

A estimulação do ponto TA7 aumentou a neurogênese de animais submetidos ao estresse de separação materna (PARK *et al.*, 2002) e a eletroacupuntura no ponto Zusanli aumentou a expressão de fatores neurotróficos no hipocampo de ratos submetidos ao estresse de imobilização (YUN *et al.*, 2002), mostrando que a acupuntura também tem ação nas alterações plásticas induzidas pelo estresse.

2.4.2. Acupuntura em Equinos

Nas últimas décadas, aumentou a busca por terapias que ajudassem na cura e na melhora do desempenho de equinos. E para satisfazer essas exigências, a acupuntura equina evoluiu e se expandiu. Hoje, a acupuntura é usada para tratar cavalos de diversas funções, incluindo cavalos de corrida, de rédeas, de enduro, de salto, de adestramento e várias outras atividades (SHOEN, 2006).

As investigações científicas ocidentais sobre os mecanismos e a eficácia dessa terapia em equinos ainda são escassas. Existem alguns trabalhos que demonstram a eficácia da acupuntura no tratamento de dor lombar crônica que é uma das principais causas de queda de desempenho, melhorando o desempenho da maioria dos cavalos atletas após 10 sessões de acupuntura em média, seja por acupuntura tradicional, eletroacupuntura, aquapuntura ou laser em pontos localizados na musculatura lombar (MARTIN; KLIDE, 1987; KLIDE; MARTIN, 1989; XIE; LIU, 1997).

Outros trabalhos demonstram o efeito da acupuntura no desempenho atlético de equinos. Segundo Harman (1997), a acupuntura, combinada ao correto encilhamento, casqueamento e técnicas de montaria melhora o desempenho. Essa melhora atinge aproximadamente 85 a 90% dos equinos tratados, retornando ao mesmo nível, ou nível

superior do desempenho original, após cerca de um a quatro tratamentos com acupuntura. Angeli & Luna (2008) observaram que o tratamento com aquapuntura nos pontos Bai Hui, VB 27, E30 e BP13, duas vezes por semana durante 3 semanas, foi capaz de melhorar a capacidade metabólica de cavalos Puro-Sangue Inglês após corrida, embora não tenha influenciado as enzimas musculares e a capacidade cardio-vascular. Em outro estudo realizado por esses mesmos autores também em 2008, o mecanismo de ação da aquapuntura não influenciou os valores hematológicos e de cortisol em cavalos da raça puro-sangue-inglês em provas de corrida, entretanto, apesar dos resultados encontrados não demonstrarem a via de efeito da aquapuntura sobre a performance de equinos atletas, pôde-se observar que: os animais do grupo controle e do grupo falsa-acupuntura obtiveram uma vitória cada um antes dos tratamentos e uma após, permanecendo na mesma média de vitórias por grupo. Já, no grupo da aquapuntura, nenhum animal havia apresentado vitórias antes do tratamento, sendo que cinco dos seis atletas tratados apresentaram pelo menos uma vitória após o período de tratamento.

Estudos comprovam a eficácia dessa terapia como tranquilizante. Luna e colaboradores (2006) compararam o efeito da farmacopuntura, aquapuntura e acepramazina na sedação de equinos em repouso e comprovaram que tanto a fármaco-acupuntura quanto a aquapuntura no ponto VG1 foram capazes promover um efeito sedativo aparente, embora não tenham observado diferença na frequência cardíaca entre os tratamentos utilizados. No entanto, GODOI (2011) objetivando avaliar o efeito da fármaco-acupuntura no estresse de transporte rodoviário em equinos, utilizando os mesmos grupos experimentais que Luna e colaboradores, observou que a fármaco-acupuntura foi capaz de diminuir o aumento da FC induzida pelo estresse.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. EXPERIMENTO 1: Efeito da acupuntura nas respostas ao estresse agudo de sobressalto em equinos

Animais

Foram utilizados 18 equinos, machos e fêmeas, com idade entre 6 e 8 anos, da raça BH, pesando entre 450 - 550 kg, provenientes da Escola de Equitação do Exército. Todos os procedimentos foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFRRJ (nº. 230833.002064/2012-10) e estão de acordo com as normas internacionais de uso de animais em pesquisa.

Todos os animais utilizados no trabalho eram cavalos atletas. Estes tinham uma mesma rotina de manejo e treinamento, tornando o grupo bastante homogêneo.

Protocolo experimental

O experimento foi realizado em dois dias consecutivos, utilizando nove animais em cada dia, iniciando às 6:30h com as coletas basais e terminando o experimento antes de 10:00h para evitar influências circadianas.

Em cada animal, em sua respectiva baia, foi realizada a colocação do frequencímetro cardíaco (Polar Equine™) ao redor do tórax e ativado. Após a ativação do frequencímetro foi realizada a coleta de sangue para a análise de cortisol sérico basal. Após a realização de todas as coletas, os animais foram divididos aleatoriamente em 3 grupos de tratamento. Os animais que foram submetidos ao tratamento de acupuntura (verdadeira e não-ponto) permaneceram com as agulhas durante 20 minutos e os animais pertencentes ao grupo controle ficaram também pelo mesmo período de 20 minutos sem qualquer manipulação.

Após o término de 20 minutos, cada animal foi levado individualmente para um picadeiro coberto onde foi submetido ao teste de sobressalto através da abertura de um guarda-chuva. Neste teste, cada o animal entrou no picadeiro conduzido pelo cabresto por uma pessoa com a qual já era familiarizado (soldado responsável pelo manejo dos

animais), contornou a pista e foi posicionado num ponto pré-determinado, de costas para a mureta que contorna pista. Quando o animal apresentou-se aparentemente tranquilo e desatento, um guarda-chuva foi aberto repentinamente por de trás da mureta a uma distância de aproximadamente 1,5m da garupa do animal (figura 4). A pessoa responsável pela abertura do guarda-chuva ficou escondida atrás da mureta, sem que o animal pudesse observá-lo. Dessa forma, o estímulo foi abrupto e inesperado. A posição do guarda-chuva formava um ângulo de aproximadamente 45 graus com a cauda do animal, possibilitando o objeto ficar dentro do campo de visão (figura 3). Uma vez aberto, o guarda-chuva foi girado por um período de 120 s. Após este tempo, os equinos permaneceram no picadeiro, presos pelo cabresto por mais 3 minutos para a análise comportamental. O comportamento de cada animal durante o experimento foi gravado em vídeo, para análise do teste de reatividade. Após esse período, animal foi levado para sua baia, onde foram feitas coletas de sangue aos 30 e 60 minutos pós-estímulo (Modificado de NICOL et al, 2005, GÓRECKA et al, 2007).

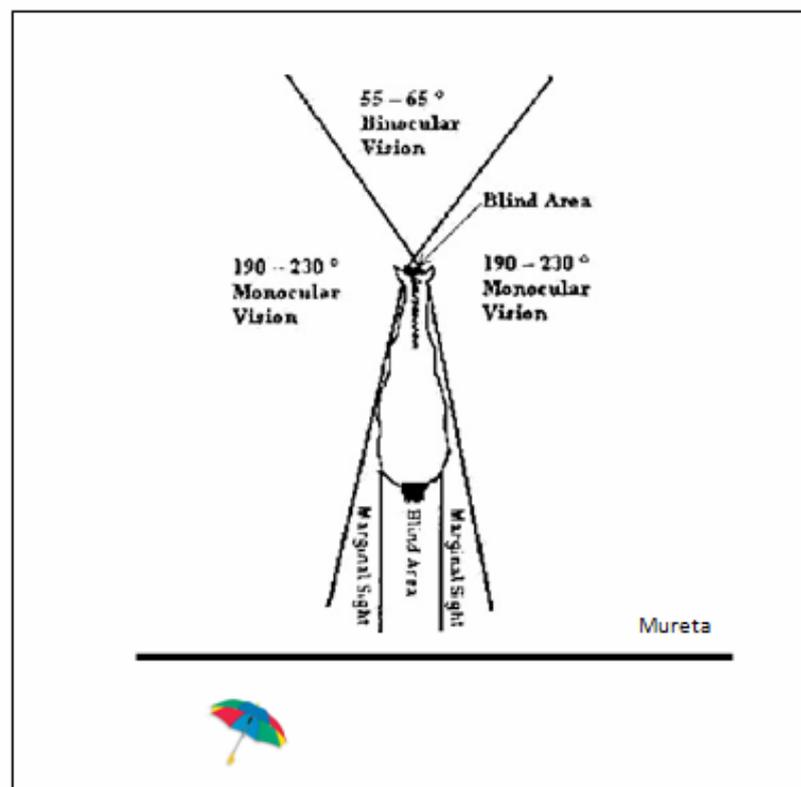


Figura 3: Localização da abertura do guarda-chuva, através do esquema de campo de visão de equinos (Fonte adaptada de <http://equitacaoespecial.blogspot.com.br/2009>).

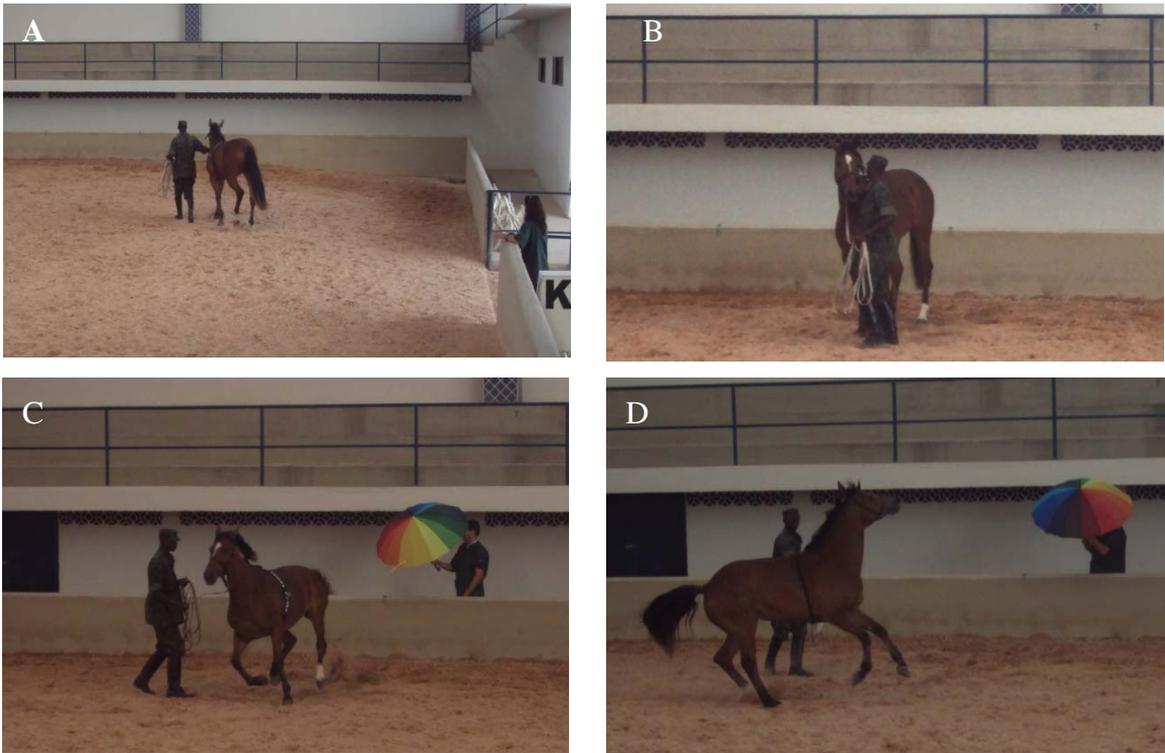
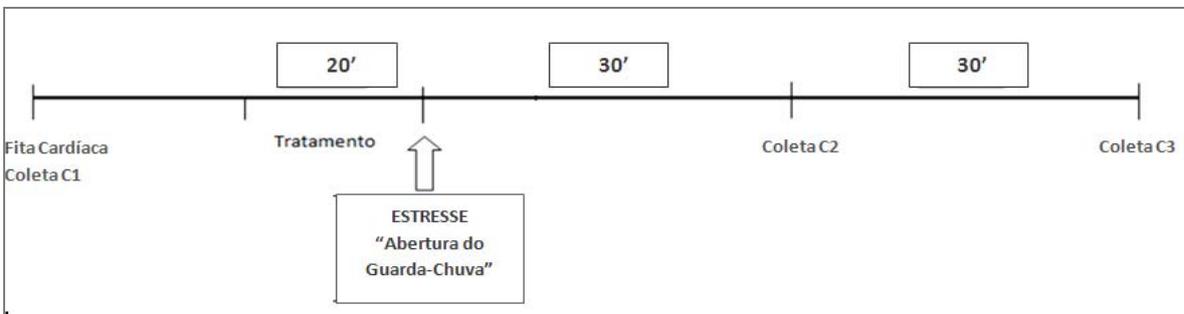


Figura 4: Foto sequenciada do modelo experimental de estresse agudo em equinos (através da abertura abrupta de um guarda-chuva). Em A: entrada do cavalo no picadeiro conduzido por um soldado. Em B: posicionamento do cavalo, conforme marcação pré-determinada. Em C e D: Reação do cavalo a abertura do guarda-chuva.

O protocolo experimental está esquematizado abaixo:



Tratamentos

Os animais foram divididos em três grupos de tratamentos:

- **CTL** (grupo Controle), os animais permaneceram por 20 minutos sem qualquer manipulação. (n=6)
- **NP** (grupo tratado com agulhas em pontos não correspondentes aos utilizados na Medicina Tradicional Chinesa (não pontos), os animais receberam agulhas esterilizadas de aço inox 0.30x40mm da marca Dongbang, com a profundidade de 2

cm, localizados a uma distância de 3 cm dos pontos VG1, C7, VG20 e B52, não sendo coincidentes com outros pontos de acupuntura. (n=6)

- **ACUP** (grupo tratado com agulhas em pontos de acupuntura (acupontos)), os animais receberam agulhas esterilizadas de aço inox 0.30x40mm, marca Dongbang com a profundidade de 2 cm nos pontos VG1, C7, VG20 e B52 (figura 5). (n=6)



Figura5: Fotografias ilustrando a localização dos pontos. Em A, o acuponto 7C; em B, o acuponto VG1; em C o acuponto VG20; e em D, o acuponto 52B.

Localização e características dos pontos (MACIOCIA, 1996; SCHOEN, 2006).

❖ VG 1

Localizado na linha média, em uma depressão entre o ânus e a base da cauda.

Inervado pelo nervo reto caudal.

Indicações:

- Nervosismo, agitação e acalma a mente.

❖ C7

Localizado no aspecto caudal do rádio, imediatamente proximal ao acessório do carpo, na inserção do flexor ulnar do carpo.

Inervado pelos nervos mediano e ulnar.

Indicações:

- Acalma o coração e a mente.
- O coração é responsável pelo equilíbrio emocional.

❖ **B 52**

Localizado a 6 cun (unidade de medida relativa na utilizada na MTC, onde 1 cun equivale, no caso dos equinos, à largura da costela flutuante à linha média dorsal, na altura dos processos espinhosos da 2ª e 3ª vértebras lombares.

Indicações:

- Tonifica o Qi do Rim e a Essência.
- Controla o medo.
- Reforça a vontade.
- É o ponto SHEM do Rim. Controla o medo

❖ **VG 20**

Localizado no ponto mais elevado da cabeça (região occipital), rostralmente a crista occipital.

Inervado pelo nervo auriculopalpebral.

Indicações:

- Reunião de todos os meridianos Yang.
- Nutre o cérebro e acalma a mente.
- Ascende o Qi límpido e clareio o espírito.

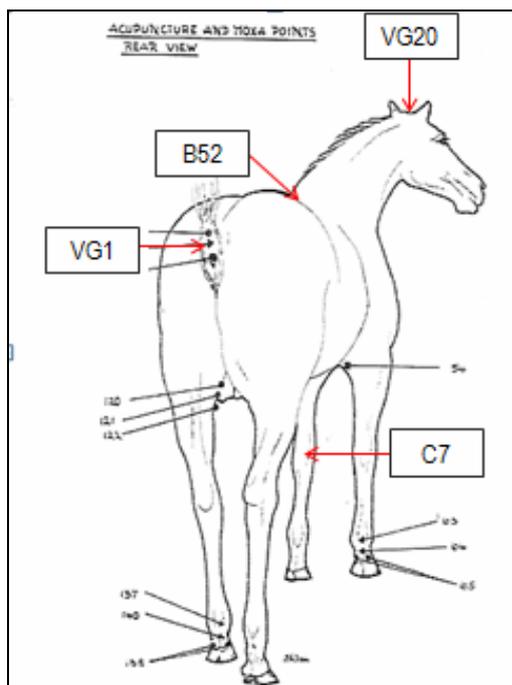


Figura 6: Esquema dos pontos de acupuntura utilizados.
Fonte adaptada: HOLISTICVETCARE, 2011

Teste de Reatividade

Os animais foram filmados por meio de uma câmera Panasonic SDR H20 posicionado a 20 metros de distância dos equinos. Os arquivos de vídeo foram analisados através do programa de uso livre Image J. Neste programa é possível avaliar a distância percorrida e o tempo.

A distância foi calculada através da captura da imagem do cavalo na posição inicial e na posição final. Foi gerada a escala de proporção e o ângulo de calibração para a padronização de todos os animais, nos dois momentos (inicial e final). Em seguida, foi feita a mensuração das coordenadas X e Y em cada imagem. Os dados gerados foram exportados para o programa Excel ® , onde foram calculadas a diferença entre X final e X inicial ($X_f - X_i$) e a diferença entre Y final e Y inicial ($Y_f - Y_i$). Em seguida esses resultados foram utilizados numa fórmula matemática calculada a partir do ângulo de calibração para a obtenção da distância (GRAVESEN et al, 2006).

O tempo foi calculado através da análise quadro-a-quadro do filme, sabendo-se a o padrão da filmagem foi 25 quadros por segundo.

As variáveis obtidas foram:

(1) Tempo de Reação, que consiste no tempo entre a realização do modelo de estresse e a resposta do cavalo (em segundos). Obtido a partir do aparecimento do primeiro ponto do guarda-chuva até o primeiro movimento de orelhas em direção ao guarda-chuva.

(2) Tempo de Resposta, que consiste no tempo total gasto no movimento em resposta a abertura do guarda-chuva (em segundos). Obtido a partir do primeiro movimento de orelhas até a parada do animal com a cabeça em direção ao guarda-chuva, após deslocamento de fuga.

(3) Distância Percorrida, distância percorrida pelo animal em resposta ao sobressalto.

Coletas de sangue

As coletas de sangue foram realizadas através punção da veia jugular. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração e ao final do experimento foram centrifugadas na velocidade 3200 RPM por 5 minutos e os soros foram estocados em freezer a -20°C.

Uso de Frequencímetros

Os intervalos RR dos animais foram registrados durante todo o tempo do experimento por um frequencímetro, RS 800 (Polar Equine®). Um eletrodo foi colocado na região precordial, no torax abaixo do codilho esquerdo, outro eletrodo próximo a cernelha na região torácica. Posteriormente, a região do eletrodo foi molhada abundantemente com uma solução preparada de água e shampoo neutro para garantir a condução dos impulsos elétricos. O transmissor do sistema capta os sinais e envia-os para o relógio do equipamento, que armazena estes dados.

Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca

Os dados armazenados no relógio foram enviados para o programa Polar Pro Trainer Equine (figura 7) por meio da interface de emissão de infravermelhos, para realizar a análise espectral da VFC.



Figura 7: Programa Polar Pro Trainer Equine Edition® (tela inicial).Fonte: Polar Pro Trainer Equine Edition®

Os dados obtidos foram dispostos num gráfico confeccionado a partir da FC (bpm) em razão do tempo (figura 8).

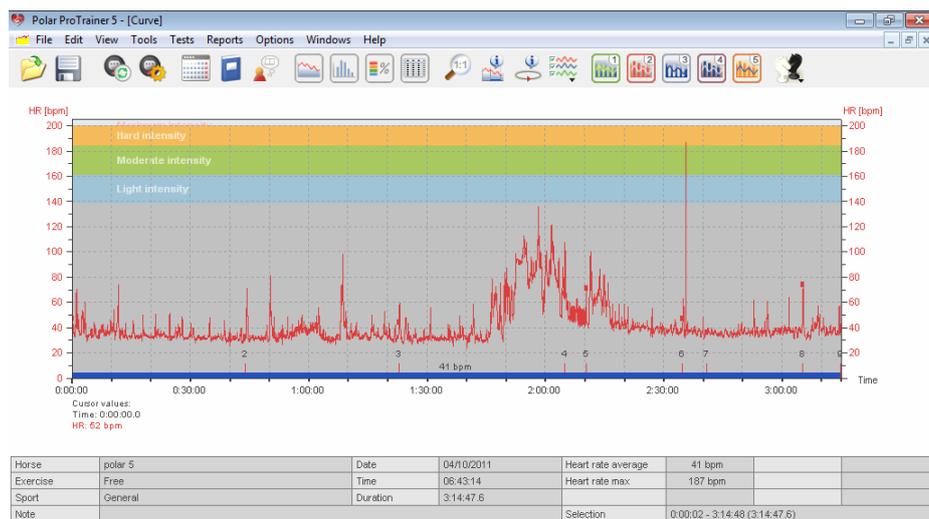


Figura 8: Gráfico confeccionado pelo programa Polar Pro Trainer 5®.

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 milissegundos (ms), no qual foi realizada a correção de alguns artefatos de leitura através da substituição dos valores de intervalos RR discrepantes pela média dos valores dos dois intervalos RR anteriores e dos dois posteriores (VON BORREL et al., 2007). Foram selecionados os seguintes momentos a serem analisados.

- Basal: momento basal (segmento com duração de 5 minutos, aproximadamente 200 batimentos cardíacos);

- Tratamento: durante os tratamentos (segmento com duração de 5 minutos, aproximadamente 200 batimentos cardíacos);
- Estresse - momento ativação simpática: selecionado a partir da diminuição abrupta dos intervalos RR (após a abertura do guarda-chuva) até o momento que este volta a subir chegando a 10% acima do valor RR mínimo atingido após estresse (segmento com duração de aproximadamente 20 a 30 segundos ou 70 batimentos cardíacos)
- Estresse - momento ativação parassimpática: selecionado a partir da diminuição abrupta dos intervalos RR (após a abertura do guarda-chuva) até o momento que este volta a subir chegando a 60% acima do valor RR mínimo atingido após estresse, (segmento com duração de aproximadamente 40 segundos ou 90 batimentos cardíacos)
- Pós-estresse: selecionado 30 minutos após a abertura do guarda-chuva com duração de 5 minutos (segmento com duração de 5 minutos, aproximadamente 200 batimentos cardíacos).

Os segmentos com os valores do intervalo RR foram exportados em arquivo de texto (TXT) para o programa HRV analysis 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 9).

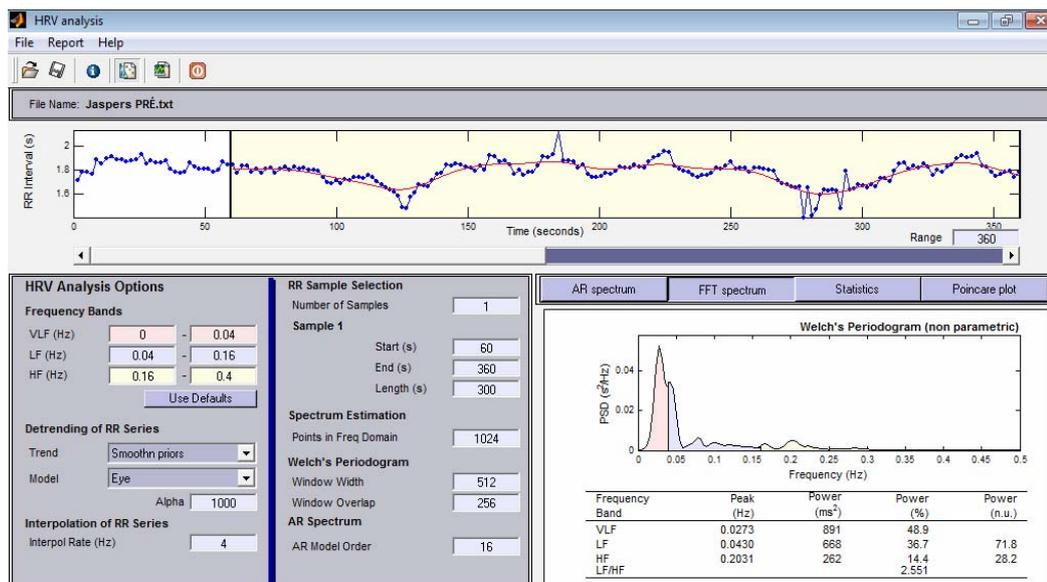


Figura 9: Tela do programa HRV analysis, demonstrando a razão entre os componentes de frequência LF e HF, a partir da FFT.

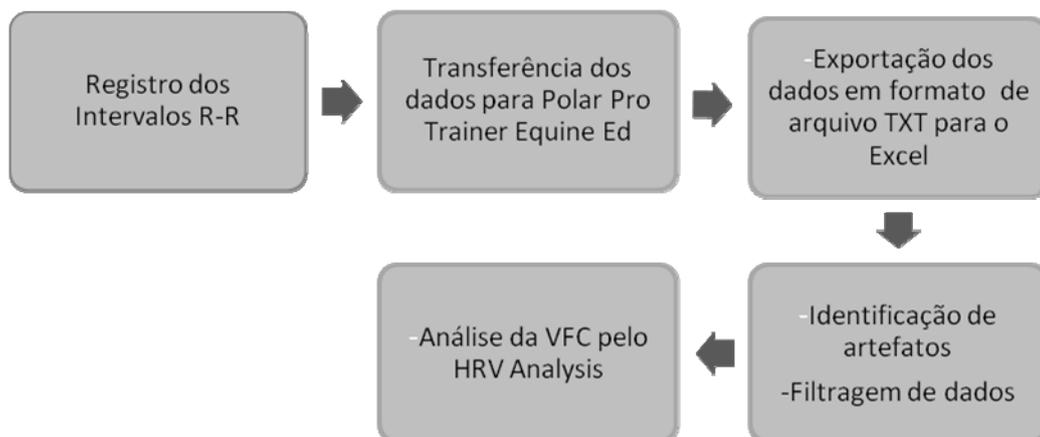


Figura 10: Algoritmo de análise dos dados por meio da Variabilidade da Frequência Cardíaca.

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 – 0,16; HF – 0,16 – 0,4; taxa de interpolação = 4 e pontos no domínio da frequência = 512 (Manual HRV Analysis).

Além disso, foram utilizados os parâmetros STDRR (desvio padrão de todos os intervalos RR do segmento, refletindo a variabilidade global do período de tempo analisado, Mean HR (Frequência Cardíaca Média) e RMSSD (raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes) para realizar a análise da VFC no domínio do tempo.

Análise do cortisol

A análise do cortisol foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia Comportamental do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFRRJ pela técnica de radioimunoensaio (RIE) com o Kit *ImmuChemTM Coated Tube Cortisol I¹²⁵ RIA*.

Após descongelamento das amostras a temperatura ambiente e preparo dos tubos e vidrarias, foi pipetado em duplicata, 25uL de diferentes concentrações padrões de cortisol do kit (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 3; 10; 30 e 100 µg/dl) nos respectivos tubos, adicionando-se 25uL dos soros a serem testados e em seguir foi adicionado 1,0 ml de Cortisol I¹²⁵ em todos os tubos. Os tubos permaneceram em banho-maria por 45 minutos a 37°C +/- 1°C

sendo feita em seguida a decantação de todos os tubos utilizando um papel absorvente. A contagem foi realizada em um contador gama calibrado para iodo radiativo (I^{125}).

Após as leituras foi confeccionado o gráfico da curva padrão de acordo com as instruções do kit e os valores de cortisol das amostras testadas foram calculados a partir dos valores de radioatividade obtidos individualmente em relação aos valores da curva padrão.

Análises Estatísticas

As variáveis quantitativas (VFC e Cortisol) foram submetidas à Análise de Variância (Anova) de duas vias para medidas repetidas e quando significativa seguida de teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Para analisar as respostas de VFC e Cortisol em tempos específicos e o teste de reatividade foi utilizada Anova de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas e os gráficos construídos através do programa GraphPad Prism 5.

3.2. EXPERIMENTO 2: Efeito da acupuntura no estresse em equinos submetidos a Reprise de Adestramento: TESTE A CAMPO

Animais

Foram utilizados 6 equinos, machos e fêmeas, com idade entre 6 e 8 anos, da raça Brasileiro de Hipismo pesando entre 450 - 550 kg, em condições saudáveis, sem sintomas de doenças.

Todos os animais utilizados no trabalho eram cavalos atletas. Estes tinham uma mesma rotina de manejo e treinamento, tornando o grupo bastante homogêneo.

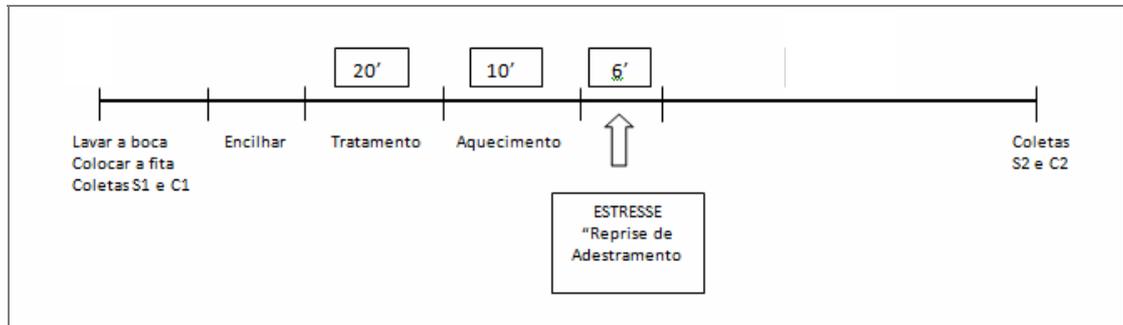
Protocolo Experimental

O experimento foi realizado em dois dias, com intervalo de uma semana. No dia 1, os animais foram submetidos a prova de adestramento sem tratamento prévio e no dia 2, os mesmos animais foram tratados com acupuntura antes da prova. Iniciando-se as 9:00h, em cada animal, em sua respectivas baia, a fita cardíaca Polar Equine ao redor do toráx foi colocada e ativada, e foram realizadas as coletas de sangue para análise de cortisol basal. No dia 1, logo após a colocação da fita e a coleta de sangue, os animais foram encilhados e ficaram pelo período de 20 minutos esperando em suas baias, estacados, sem qualquer tipo de manipulação. Após esse período, os animais foram conduzidos para a área ao redor do picadeiro para o aquecimento por 10 minutos. Em seguida, foram conduzidos ao picadeiro onde foram submetidos a uma Reprise de Adestramento. No dia 2, nos mesmos animais, após o encilhamento os animais foram submetidos ao tratamento de acupuntura, que consistiu na aplicação de agulhas de aço inox 0.30x40mm, marca Dongbang com a profundidade de 2 cm nos pontos VG1, C7, VG20 e B52. Após 20 minutos sem qualquer manipulação, as agulhas foram retiradas e os animais foram conduzidos para a área ao redor do picadeiro para o aquecimento de 10 minutos. Ao término desse período, os cavalos foram conduzidos ao picadeiro onde foram submetidos a uma Reprise de Adestramento.

A Reprise teve duração de aproximadamente 6 minutos. No momento da reprise os animais foram avaliados por dois juízes oficiais (credenciados pela CBH) e pelos seus respectivos cavaleiros, que não sabiam em que grupo o animal em que grupo o animal pertencia. Ao término da reprise, os animais foram levados até suas baias, onde foram

desencilhados. Após 30 minutos do término da reprise, foi realizada a coleta de sangue para análise de cortisol sérico.

Desenho Experimental:



Tratamentos

Dia 1: os animais permaneceram por 20 minutos sem qualquer manipulação. (n=6)

Dia 2: os mesmos animais receberam agulhas de metal 0.30x40mm, marca Dongbang com a profundidade de aproximadamente 2 cm nos pontos VG1, C7, VG20 e B52 (os mesmos pontos utilizados no experimento 1). (n=6)

Reprise de Adestramento

No presente estudo, a prova foi organizada de acordo com as prescrições contidas no Regulamento da CBH (2012).

A reprise foi realizada em um picadeiro fechado (Anexo 8.3), e consistiu em uma série Preliminar com duração de aproximadamente 6 minutos. As reprises foram executadas inteiramente de cor e todos os movimentos foram realizados na ordem indicada pelo teste (Anexo 8.5).

Análise do cortisol e da variabilidade da frequência cardíaca

As análises de cortisol e da VFC seguiram os mesmos protocolos do experimento 1. E foram analisadas nos momentos basal e 30 minutos após a reprise.

Avaliação dos Juízes

Dois juízes foram posicionados ao longo do lado menor do picadeiro, a uma distância de 2 metros do cercado.

Todos os movimentos e determinadas transições, que foram julgados pelos juízes, estão numerados nas folhas de juízes (Anexo 8.5).

A avaliação dos juízes consistiu na avaliação da técnica a qual foi realizada durante a reprise e na avaliação do conjunto, a qual foi realizada logo após a reprise.

Os animais receberam graus de 0 a 10 dados por cada juiz, de acordo com a seguinte correlação.

10 - Excelente	4 - Insuficiente
9 - Muito Bom	3 - Quase mal
8 - Bom	2 - Mal
7 - Quase bom	1 - Muito mal
6 - Satisfatório	0 - Não executado
5 - Suficiente	

Avaliação dos Cavaleiros

Logo após a reprise, os cavaleiros receberam um questionário (Anexo 8.3) no qual os cavalos foram avaliados quanto à flexibilidade, relaxamento, concentração/atenção, aceitação/obediência e vontade. A pontuação variou de 0 a 10.

Análises Estatísticas

As variáveis quantitativas (VFC e Cortisol) foram submetidas à Anova de duas vias para medidas repetidas, quando significativas foram comparadas pelo Teste de Bonferroni, a 5% de probabilidade. As variáveis semi-quantitativas (análise comportamental) pelo teste Kruskal Wallis. Para correlação entre os parâmetros (cortisol, VFC, notas dos juizes e cavaleiros) foi utilizada a Correlação de Spearman. As análises foram realizadas e os gráficos construídos através do programa GraphPad Prism 5.

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIMENTO 1: Efeito da acupuntura nas respostas ao estresse agudo de sobressalto em equinos

4.1.1. Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca

O teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou na razão LF/HF diferença significativa no fator Tempo ($F_{(4, 52)} = 63,64$; $p < 0,0001$). Os três grupos demonstraram um aumento significativo da LF/HF no momento estresse (momento de ativação simpática e momento de ativação parassimpática) em relação aos momentos basal e pós-estresse, demonstrando uma maior ativação do componente simpático em relação ao parassimpático, em todos os animais, durante o estímulo de sobressalto. Além disso, foi verificado o retorno aos valores de LF/HF apresentados antes do estresse, no momento pós-estresse (30 minutos após o término do estímulo). Nos fatores Interação $F_{(8, 52)} = 1,350$; $p = 0,2407$ e Grupo $F_{(2, 52)} = 0,7641$; $p = 0,4856$ não houve diferença significativa (Figura 11). O grupo ACUP no momento ativação parassimpática foi avaliado pelo teste ANOVA de uma via, que detectou diferença significativa ($p = 0,0330$). O teste de comparações múltiplas Newman-Keuls foi capaz de identificar diferenças entre o grupo ACUP e CTL ($p < 0,05$), onde o grupo ACUP apresentou valores significativamente menores que o CTL (Figura 12).

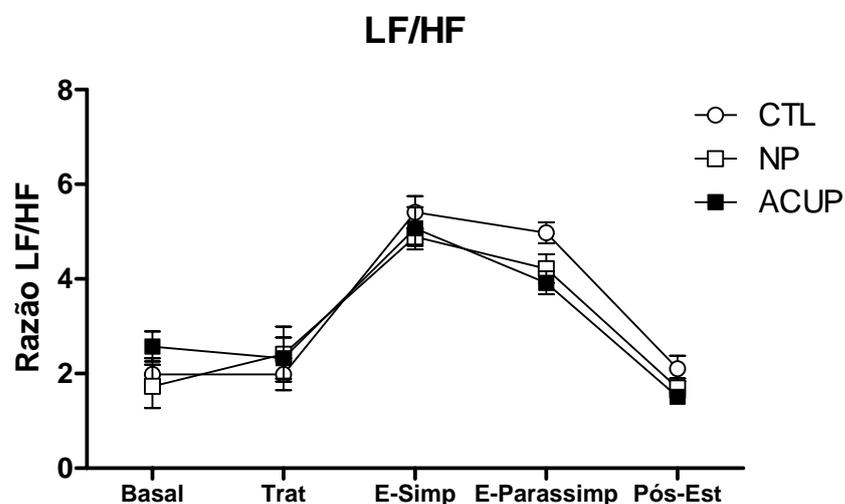


Figura 11: Efeito da acupuntura na VFC, expressa pela razão LF/HF de equinos submetidos ao estresse agudo de sobressalto. Antes do teste de sobressalto (abertura abrupta de um guarda-chuva), os equinos foram tratados com acupuntura por 20 min nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (NP) e não tratados (CTL). Os dados são apresentados como média \pm epm da Razão LF/HF nos momentos basal, tratamento (Trat) estresse momento ativação simpática (E-Simp), estresse momento ativação parassimpática (E-Parassimp) e pós-estresse (Pós-Est).

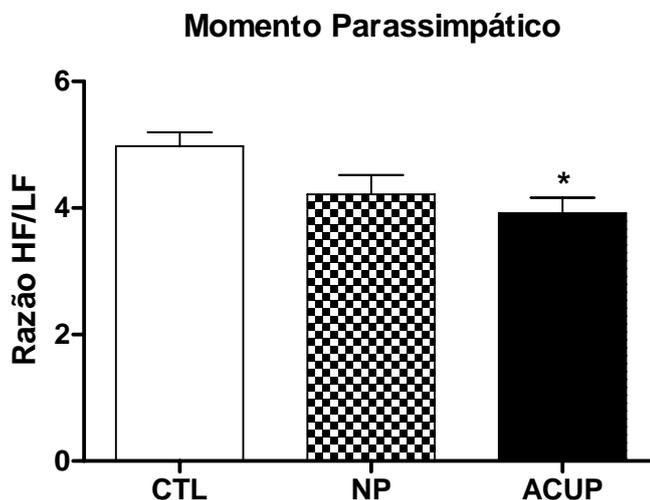


Figura 12: Efeito da acupuntura na VFC, expressa pela razão LF/HF de equinos submetidos ao teste de sobressalto momento de ativação parassimpática. Antes do teste de sobressalto (abertura abrupta de um guarda-chuva), os equinos foram tratados com acupuntura por 20 min nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (NP) e não tratados (CTL). Os dados são apresentados como média \pm epm da Razão LF/HF no momento de ativação parassimpática. * indica diferença significativa do grupo ACUP em relação ao grupo CTL (ANOVA de uma via seguida teste de comparações múltiplas Newman-Keuls, $p < 0,05$).

Na análise estatística dos componentes de baixa frequência (LF), o teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator Tempo ($F_{(4, 52)} = 47,61$; $p < 0,0001$). Os três grupos demonstraram um aumento significativo do componente LF no momento estresse (momento de ativação simpática e momento de ativação parassimpática) em relação aos momentos basal e pós-estresse, demonstrando uma maior ativação componente simpático em todos os animais, durante o estímulo de sobressalto. Foi verificado o retorno aos valores de LF apresentados antes do teste, no momento pós-estresse (30 minutos após o término do estímulo) (figura 13). Nos fatores Interação $F_{(8, 52)} = 2,05$; $p = 0,0583$ e Grupo $F_{(2, 52)} = 0,17$; $p = 0,846$ não houve diferença significativa.

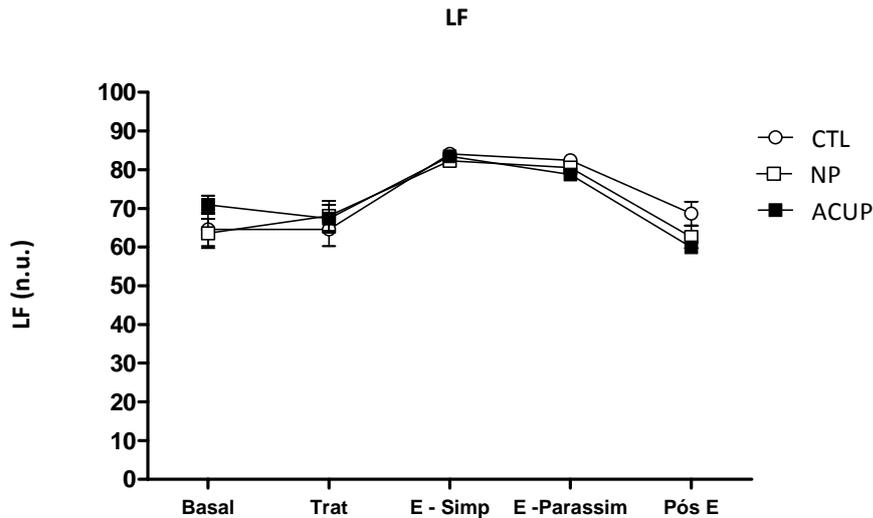


Figura 13:Efeito da acupuntura na VFC, no componente de baixa frequência (LF) de equinos submetidos ao teste de sobressalto. Os dados são apresentados como média \pm epm do componente HF nos momentos: basal tratamento, estresse - ativação simpática, estresse ativação parassimpática e pós-estresse. Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum momento.

Na análise estatística dos componentes de alta frequência (HF), o teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator Tempo ($F_{(4, 52)} = 63,44$; $p < 0,0001$). Os três grupos demonstraram uma diminuição significativa do componente HF no momento estresse (momento de ativação simpática e momento de ativação parassimpática) em relação aos momentos basal e pós-estresse. Foi verificado o retorno aos valores de LF apresentados antes do estresse, no momento pós-estresse (30 minutos após o término do estímulo) (figura 14). Nos fatores Interação $F_{(8, 52)} = 2,047$; $p = 0,0586$ e Grupo $F_{(2, 52)} = 0,1729$; $p = 0,8432$ não houve diferença significativa.

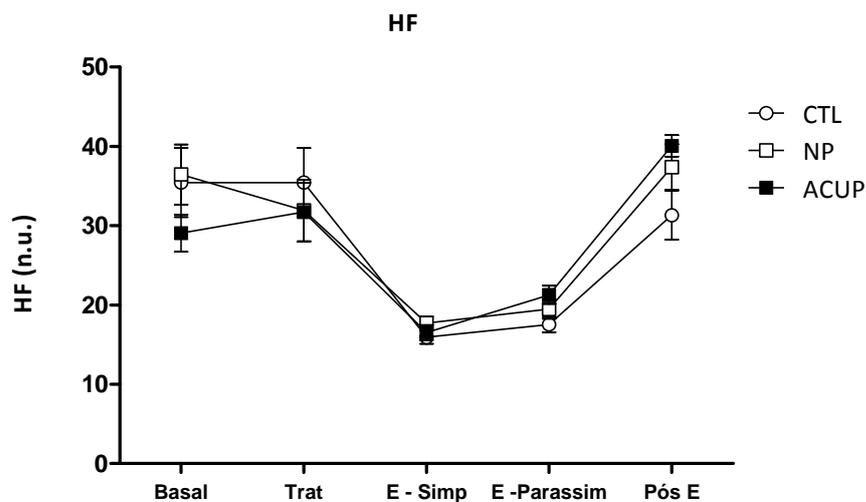


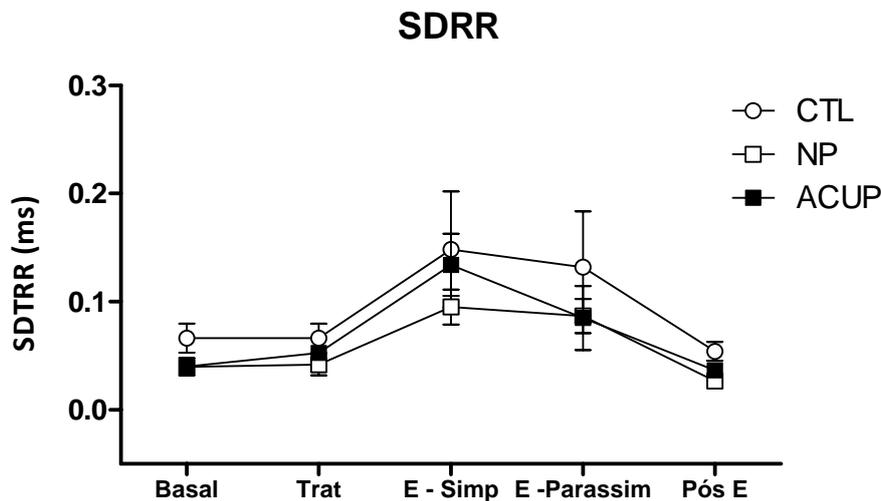
Figura 14:Efeito da acupuntura na VFC, no componente de alta frequência (HF) de equinos submetidos ao teste de sobressalto. Os dados são apresentados como média \pm epm do componente HF nos momentos: basal tratamento, estresse - ativação simpática, estresse ativação parassimpática e pós-estresse. Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum momento.

parassimpática e pós-estresse. Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum momento estudado.

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

O valor de SDRR, quando diminui, indica o incremento simpático, sendo portanto esperado uma diminuição dos valores no momento do estresse. No entanto, embora a ANOVA de duas vias para medidas repetidas tenha detectado diferença significativa no fator Tempo ($F_{(4,48)} = 10,19$; $P < 0,0001$), ao contrário do esperado, houve um aumento significativo nos momentos de estresse. Não foram observadas diferenças significativas nos fatores grupo ($F_{(2, 48)} = 1,446$; $p = 0,2737$) e interação ($F_{(8,48)} = 0,2512$; $p = 0,9782$) (figura 15 A).

O valor de RMSSD aumenta conforme o incremento da ativação parassimpática. Na análise da RMSSD, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator Tempo ($F_{(4,52)} = 3,554$; $p < 0,0001$). Não foram observadas diferenças significativas nos fatores Grupo ($F_{(2, 52)} = 1,368$; $p = 0,2889$) e interação ($F_{(8, 52)} = 0,3289$; $p = 0,9511$). No Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni, não foram detectadas diferenças significativas entre os grupos (figura 15 B).



RMSSD

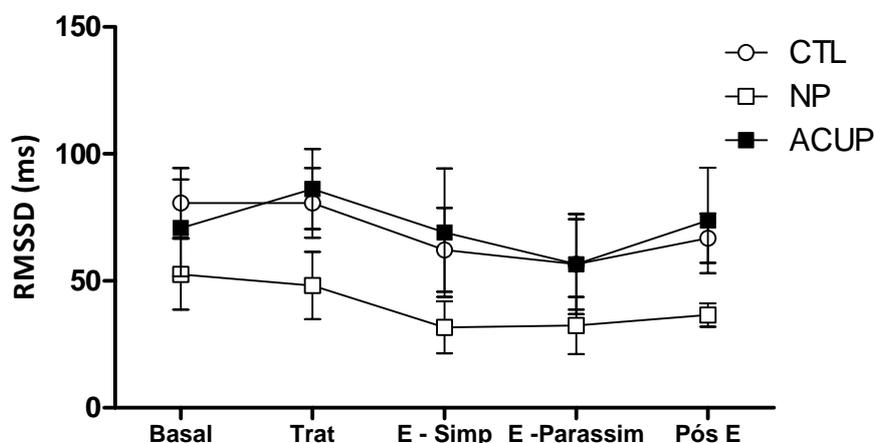


Figura15:Efeito da acupuntura no SDRR (Desvio padrão de todos os intervalos RR do segmento) (A) e no RMSSD (raiz quadrada da média das diferenças entre intervalos entre batimentos consecutivos elevadas ao quadrado) (B) de equinos submetidos ao estresse de agudo de sobressalto. Os dados apresentados correspondem à SDRR em MS (milessegundos) \pm epm e à RMSSD em ms \pm epm nos momentos basal, tratamento, estresse e pós-estresse. Na análise dos dados obtidos de SDRR e de RMSSD pela ANOVA de duas vias para medidas repetidas não se detectaram diferenças significativas nos fatores grupo e interação, apenas no fator tempo ($p < 0.0001$).

Na análise da FC média a ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator Tempo ($F_{(4, 52)} = 170,90$; $p < 0,0001$) e no fator Grupo ($F_{(2, 52)} = 4,622$; $p = 0,0305$), não apresentando diferença no Interação ($F_{(8, 52)} = 0,7974$; $p = 0,6075$). Os três grupos demonstraram um aumento significativo da FC média no momento estresse (tanto no momento de ativação simpática quanto no de ativação parassimpática) em relação aos momentos basal e tratamento. Além disso, foi observado o retorno aos valores de FC média no momento pós-estresse (figura 16). O teste de comparações múltiplas de Bonferroni detectou diferença significativa no momento estresse ativação parassimpática entre os grupos NP e ACUP ($p < 0,05$), no entanto não detectou entre estes e o CTL (Figura 16).

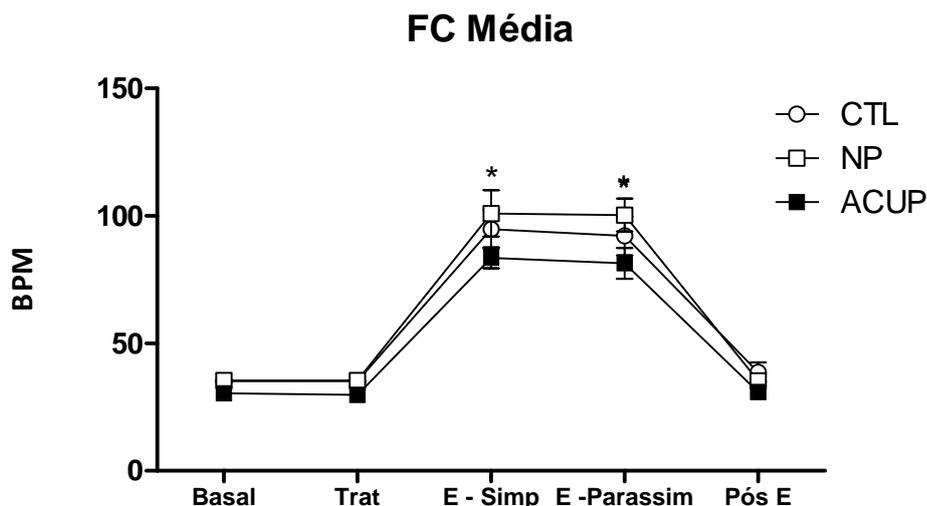


Figura 16: Efeito da acupuntura na Frequência Cardíaca Média de equinos submetidos ao estresse de agudo de sobressalto. Os dados apresentados correspondem à batimentos por minuto \pm epm nos momentos basal, tratamento (trat), estresse ativação simpática (E-Simp), estresse ativação parassimpática (E-Parassim) e pós-estresse (Pós E). * indica diferença significativa do grupo NP em relação ao grupo ACUP (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida teste de comparações múltiplas de Bonferroni, $p < 0,05$).

4.1.2. ANÁLISE DO CORTISOL SÉRICO

Na análise dos níveis de cortisol sérico, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferença significativa nos fatores Tempo ($F_{(2, 41)} = 1,32$; $p = 0,2823$), Interação ($F_{(4, 41)} = 2,495$; $p = 0,0639$) e nem Grupo ($F_{(2, 41)} = 0,4537$; $p = 0,6437$) (Figura 17). No entanto, analisando cada momento pela Anova de uma via, foi detectada diferença significativa no momento 30 min pós-estresse, onde o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls detectou que o grupo ACUP apresentou cortisol serico significativamente menor que o grupo CTL ($p = 0,0043$) (Figura 18).

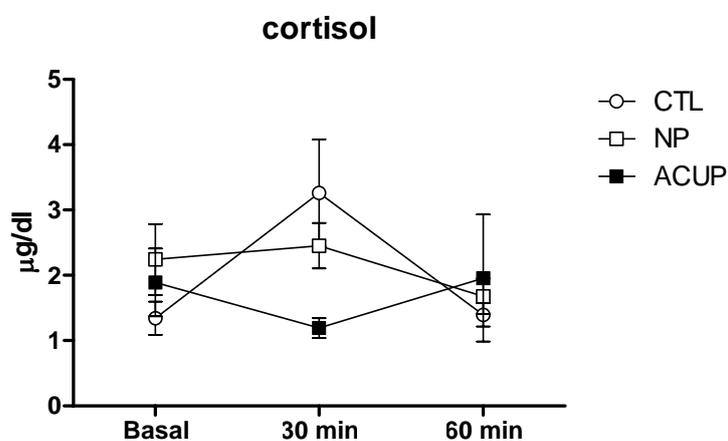


Figura 17: Efeito da acupuntura na concentração de Cortisol Sérico de equinos submetidos ao estresse de agudo de sobressalto. Cortisol sérico em $\mu\text{g/dl}$, antes (basal), 30 min e 60 min após ao estresse de agudo de sobressalto (abertura abrupta de um guarda-chuva). Os equinos foram previamente tratados por 20 min com acupuntura nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (NP) e não tratados (CTL).

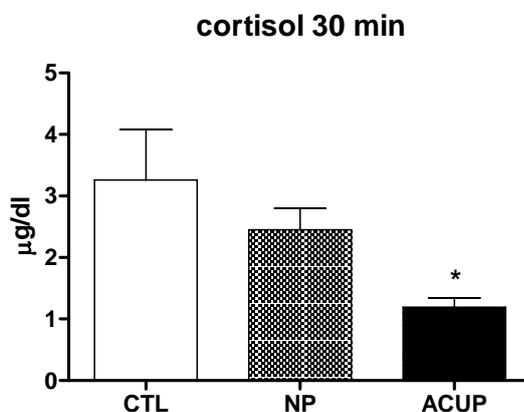


Figura 18: Efeito da acupuntura no Cortisol Sérico de equinos 30 minutos pós-estresse. Cortisol sérico em $\mu\text{g/dl}$, antes (basal), 30 min e 60 min após ao estresse de agudo de sobressalto (abertura abrupta de um guarda-chuva). Os equinos foram previamente tratados por 20 min com acupuntura nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (NP) e não tratados (CTL). * indica diferença significativa do grupo ACUP em relação ao grupo CTL (Anova de uma via seguida de teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls, $P < 0,05$).

4.1.3. Análise Comportamental: Teste de Reatividade

Foi observado resposta comportamental em 17 dos 18 animais que participaram do experimento (Tabela 1). A Anova de 1 via não detectou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados (tempo de reação ($p = 0,1728$) (Figura 19A), tempo de resposta ($p = 0,9754$) (Figura 19 B) e distância percorrida ($p = 0,1845$) (Figura 19 C)).

Tabela 1: Efeito da acupuntura na reação comportamental (sobressalto) de equinos ao estresse de agudo de sobressalto (Teste de Reatividade).

	T REAC (s)	T RESP (s)	DIST (cm)
CTL	0,69 ± 0,41	4,46 ± 1,96	515,67 ± 275,80
NP	0,45 ± 0,18	3,78 ± 0,79	307,83 ± 171,89
ACUP	0,56 ± 0,14	3,72 ± 1,06	447,13 ± 124,65

Tempo de Reação (T REAC), que consiste no tempo entre a realização do modelo de estresse e a resposta do cavalo em questão de segundos, Tempo de Resposta (T RESP), que consiste no tempo total gasto no movimento em resposta a abertura do guarda-chuva em segundos e Distância Percorrida (DIST) pelo animal em resposta ao sobressalto em centímetros.

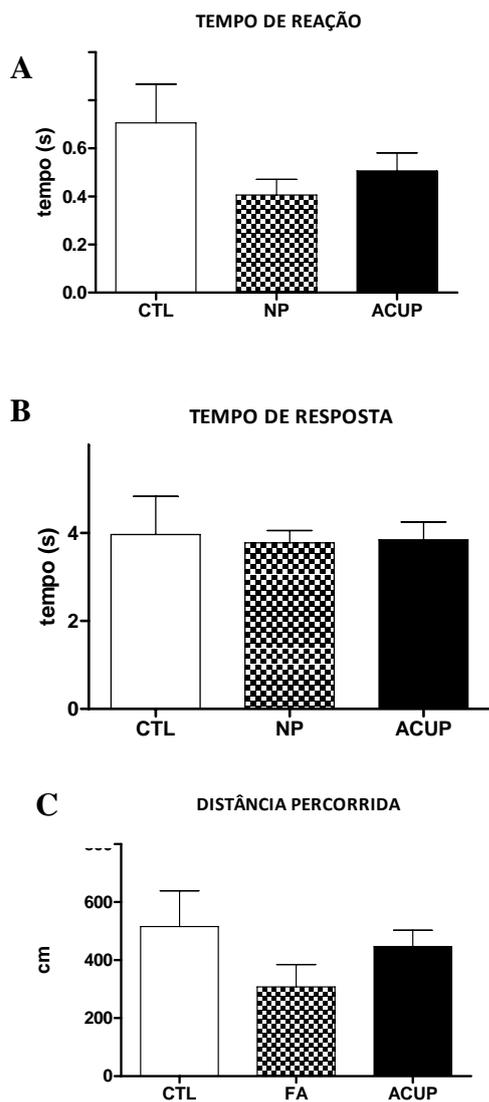


Figura 19: Efeito da acupuntura na reação comportamental (sobressalto) de equinos ao estresse de agudo de sobressalto (Teste de Reatividade). Em A: O efeito da acupuntura no tempo de reação, que consiste no tempo entre a realização do modelo de estresse e a resposta do cavalo em questão de segundos. **Em B:** O efeito da acupuntura no tempo de resposta, que consiste no tempo total gasto no movimento em resposta a abertura do guarda-chuva em segundos. **Em C:** O efeito da acupuntura na distância Percorrida pelo animal em resposta ao sobressalto em centímetros. Anova de 1 via não detectou diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisado.

4.2. EXPERIMENTO 2: Efeito da acupuntura no estresse em equinos submetidos a Reprise de Adestramento: TESTE A CAMPO

4.2.1. Análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca

O teste ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou na razão LF/HF diferença significativa no fator Grupo ($F_{(1, 9)} = 14,01$; $p = 0,0046$). Nos fatores Interação ($F_{(1, 9)} = 1,029$; $p = 0,3369$) e Tempo ($F_{(1, 9)} = 0,9535$; $p = 0,3543$) não houve diferença significativa (Figura 20).

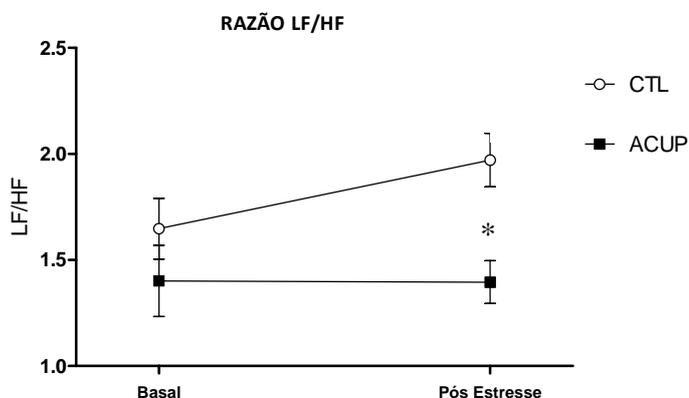


Figura 20: Efeito da acupuntura na VFC, expressa pela razão LF/HF de equinos submetidos a reprise de Adestramento. No dia 1 os animais não foram tratados (CTL). No dia 2, antes da reprise os equinos foram tratados com acupuntura por 20 min nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (ACUP). Os dados são apresentados como média \pm epm da Razão LF/HF nos momentos basal e pós-estresse. * indica diferença significativa do ACUP em relação ao CTL (ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida de $P < 0,05$)

Na análise estatística dos componentes de baixa frequência (LF) e dos componentes de alta frequência (HF), a ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator Grupo ($F_{(1, 10)} = 8,950$; $p = 0,0135$) sem detectar diferença nos fatores Interação $F_{(1, 10)} = 0,2203$; $p = 0,6489$) e Tempo $F_{(1, 10)} = 0,5233$; $p = 0,4860$). O teste de comparações múltiplas de Bonferroni detectou diferença significativa entre CTL e ACUP no momento 30 minutos pós-estresse (Figura 21).

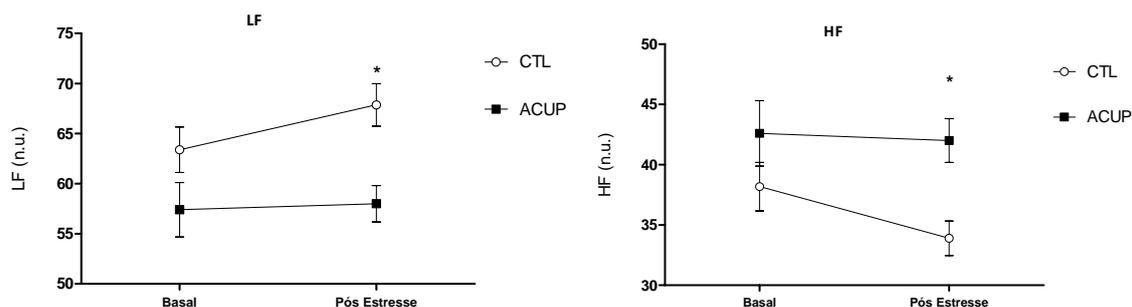


Figura 21: Efeito da acupuntura na VFC, no componente de baixa frequência (LF) (esquerda) e no componente de alta frequência (HF) (a direita) de equinos submetidos a reprise de Adestramento. Os dados são apresentados como média \pm epm do componente LF e HF nos momentos basal e pós-estresse.* indica diferença significativa do ACUP em relação ao CTL ($p < 0,05$) no pós-estresse (Anova de duas vias para medidas repetidas).

4.2.2. Análise dos Níveis de Cortisol Sérico

Na análise dos níveis de cortisol sérico, a ANOVA de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator Tempo ($F_{(1, 9)} = 11,03$; $p = 0,0089$). Nos fatores Interação $F_{(1, 9)} = 1,145$; $p = 0,3124$ e Grupo $F_{(1, 9)} = 4,839$; $p = 0,0554$ (figura 22) não foi observado diferença significativa. No teste de comparações múltiplas de Bonferroni não houve diferença significativa entre os grupos.

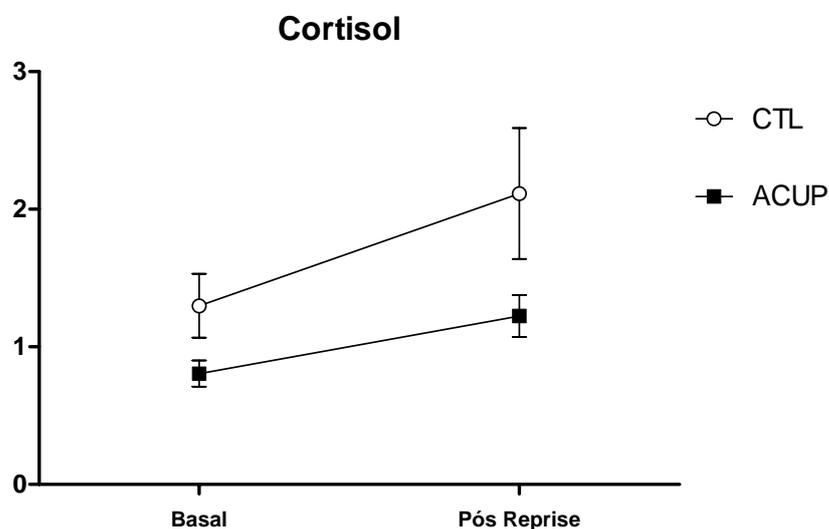


Figura 22: Efeito da acupuntura na concentração de Cortisol Sérico de equinos submetidos a reprise de Adestramento. Cortisol sérico em $\mu\text{g/dl}$, antes (basal), após a reprise. Os equinos foram previamente tratados por 20 min com acupuntura nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (ACUP); com agulhas em não pontos por 20 min em regiões próximas aos pontos VG1, VG20, C7 e B52 (NP) e não tratados (CTL). A anova de duas vias detectou diferença significativa no fator tempo.

4.2.3. Avaliação dos Juízes

O teste de Kruskal-Wallis não detectou diferença significativa no desempenho dos animais ao serem tratados com acupuntura, tanto na avaliação técnica quanto na avaliação do conjunto feitas pelos juízes oficiais.

A) Avaliação Técnica

Tabela2: Pontuação total (média dos dois juízes oficiais). Avaliação técnica realizada durante a execução da reprise de adestramento, seguindo modelo de avaliação padrão CBH. (Anexo 6,4).

ANIMAIS	CTL	ACUP
1	163,0	168,0
2	162,5	161,5
3	152,0	155,0
4	160,5	166,0
5	160,5	166,0
6	164,0	162,5
médias	160,4 ± 4,3	163,2 ± 4,7

B) Avaliação do Conjunto (Cavalo/Cavaleiro)

Tabela 3: Pontuação total (média dos dois juízes oficiais). Avaliação do conjunto realizada após execução da reprise de adestramento, seguindo modelo de avaliação padrão CBH. (Anexo 6,4).

ANIMAIS	CTL	ACUP
1	38,0	38,0
2	36,0	36,5
3	33,0	33,0
4	36,0	36,5
5	37,5	37,0
6	38,5	36,5
	36,5 ± 2,0	36,2 ± 1,7

4.2.4. Avaliação dos Cavaleiros

Através da avaliação realizada pelos cavaleiros, o teste de Kruskal-Wallis não detectou diferença significativa no desempenho dos animais ao serem tratados com acupuntura.

Tabela 4: Pontuação total. Avaliação realizada pelos cavaleiros logo após a execução da reprise de adestramento através de questionário. Foi avaliado flexibilidade, relaxamento, concentração, aceitação e vontade. (Anexo 6.3)

ANIMAIS	CTL	ACUP
1	37	36
2	33	32
3	34	29
4	28	32
5	29	31
6	21	22
Media	30,33 ± 5,64	30,33 ± 4,68

4.2.5. Análise de Correlação

Foi observado correlação apenas entre a avaliação técnica e avaliação do conjunto realizada pelos juízes, não sendo observado nos demais parâmetros estudados.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo demonstrar o efeito do tratamento com acupuntura no balanço simpato-vagal, através da análise da Variabilidade da Frequência Cardíaca, na resposta endócrina através da análise do cortisol sérico e nas respostas comportamentais de equinos submetidos a um modelo experimental de estresse agudo através da abertura abrupta de um guarda-chuva (teste de sobressalto) e através de uma prova da modalidade hípica adestramento. O tratamento com acupuntura foi realizado antes do estímulo estressor nos pontos VG 1, VG20, C7 e B52 por 20 minutos. Vale ressaltar, que o tratamento foi realizado apenas uma vez antes do estímulo estressor.

5.1. EXPERIMENTO 1: Efeito da acupuntura nas respostas ao estresse agudo de sobressalto em equinos

5.1.1. O modelo experimental

A mensuração dos níveis de estresse pode ser realizada através de parâmetros fisiológicos e comportamentais. Em equinos, as respostas de estresse são bem descritas e incluem aumento dos níveis de cortisol sérico, da frequências respiratória e cardíacas, da variabilidade da frequência cardíaca e alterações comportamentais (DOBROMYLSKYJ ET al., 2000; SCHATZMANN, 2000; RIETMANN et al., 2004; VISSER et al, 2008).

As respostas fisiológicas induzidas pelo modelo experimental de exposição a um objeto novo (“Teste do Guarda-Chuva”) vêm sendo estudadas por diversos autores. (VISSER et al., 2001; NICOL et al., 2005; VISSER et al, 2008; CHRISTENSEN et al., 2010).

A adaptação do modelo experimental do “Teste do Guarda-Chuva” como um modelo de sobressalto, onde guarda-chuva é aberto abruptamente próximo ao animal, se mostrou eficaz. A análise espectral da Variabilidade da Frequência Cardíaca evidenciou que a abertura abrupta do guarda-chuva produziu aumento significativo na razão LF/HF e na FC média tanto no momento de ativação simpática quanto no momento de ativação parassimpática em relação aos momentos basal, tratamento e pós-estímulo. Este aumento na razão LF/HF foi consequência do aumento significativo do componente de alta frequência (LF) e da diminuição significativa do componente de baixa frequência (HF). Considerando que o HF representa a atividade do Sistema Nervoso Simpático e que LF

representa exclusivamente a atividade vagal para o coração (KAREMAKER & LIE, 2000; HOSHI, 2009; VANDERLEI, 2009), podemos concluir que houve um aumento da regulação simpática em relação a parassimpática nesses momentos. A análise espectral ainda mostrou que não houve diferenças significativas nos valores de LF/HF entre os momentos basal, tratamento e no momento pós-estresse, sugerindo que não houve diferença na regulação autonômica nesses momentos.

A análise espectral da VFC, tendo como parâmetro principal a razão LF/HF, 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).

Em nosso estudo, ao contrario do que era esperado, o SDRR aumentou significativamente no estresse (em ambos os momentos). Talvez isso possa ser explicado porque utilizamos segmentos muito pequenos nos momentos de estresse (< 1 min), ocorrendo então um erro na análise dos dados, já que o SDRR é um registro de longa duração (HOSHI, 2009). Segundo Borell (2010), SDRR é o desvio padrão de todos os intervalos R-R em um dado período de tempo (de pelo menos 5 minutos), refletindo a variabilidade global do período de tempo analisado.

O parâmetro RMSSD é utilizado para estimar variações do intervalo RR que representam principalmente atividade regulatória vagal. Nossos demonstram um diminuição significativo dos valores de RMSSD no estresse. Desta forma, o modelo utilizado foi capaz de promover aumento do balanço simpato-vagal que consiste num importante indicativo de estresse, corroborando com Visser e colaboradores que demonstraram que o estresse provocado através do modelo experimental de exposição a um objeto novo (“Teste do Guarda-Chuva”) induz um estado fisiológico caracterizado por um aumento significativo da média da frequência cardíaca (53.7 ± 1.4 para 159.5 ± 4.4 bpm) e uma diminuição de $rMSSD = 46,3 \pm 4,8$ para $15,8 \pm 1,9$ ms).

O RMSSD é o principal índice utilizado como indicador de reativação parassimpática sendo geralmente calculado em janelas de tempo de 30 segundos (BUCHHEIT et al., 2007), portanto, os segmentos pequenos não influenciaram negativamente como ocorreu com SDTRR.

O índice SDRR é obtido a partir de registros de longa duração e representam as atividades simpática e parassimpática, porém não permite distinguir quando as alterações da VFC são devidas ao aumento do tônus simpático ou à retirada do tônus vagal. Já os

índices RMSSD representam a atividade parassimpática, pois são encontrados a partir da análise de intervalos RR adjacentes (HOSHI, 2009).

A análise da VFC durante o estresse em equinos 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.

Nossos resultados adicionam e confirmam evidências apresentadas em trabalhos anteriores que utilizaram a VFC como ferramenta de estudo, que a submissão de equinos a um objeto novo ou inesperado pode ser considerado um estressor.

Em relação a análise comportamental avaliada através do teste de reatividade, o modelo de estímulo estresse utilizado em nosso estudo foi capaz de produzir resposta comportamental em quase todos os animais (exceto um animal que não apresentou reação comportamental). A resposta comportamental foi caracterizada por reação de sobressalto e fuga que são indicativas de resposta de estresse agudo (REDONDO et al., 2010).

O nível de cortisol é considerado um dos principais parâmetros para se avaliar níveis de estresse em humanos e animais, constituindo uma evidência da ativação do Eixo HHA, um dos principais sistemas acionados em situações de estresse. Concentrações de cortisol plasmático tem sido frequentemente utilizado para caracterizar as respostas de estresse dos cavalos (ALEXANDER et al., 1988; MARTINEZ et al, 1988; MAL et al, 1991; DICKSON, 1996; TEIXEIRA e PADUA, 2000; REDONDO, 2009; CAYADO, 2006). No entanto, nossos resultados mostram que não houve diferença significativa nos níveis de cortisol sérico após o estresse, contrariando esses estudos. Nesse contexto, devemos considerar o tipo de estresse que o animal está sendo submetido. O estresse de abate, o transporte e competições de cavalos atletas representam um estresse muito mais intenso que o modelo experimental utilizado. Desta forma, podemos considerar que o estímulo de sobressalto não foi suficientemente intenso para produzir aumento dos níveis de cortisol.

Outro fato importante é que é preciso ter cuidado na interpretação dos resultados de ensaios de cortisol, uma vez que produção de cortisol é influenciada por uma série de fatores (RUSHEN, 1986). A secreção de cortisol obedece a um ritmo circadiano, ocorrendo o pico pela manhã (IRVINE & ALEXANDER, 1994). Estes ritmos podem ser perturbada pelo exercício, a cópula, excitação e estressores como punção venosa ou remoção de um indivíduo de seu ambiente (RUSHEN, 1986, ALEXANDER et al, 1991;. COLBORN et al, 1991;. IRVINE, 1994).

Esse modelo torna-se interessante porque simula situações cotidianas em que cavalos apresentam reações de sobressalto. Frequentemente cavalos de outras modalidades hípicas que não são treinados apenas em pistas são submetidos a diversos tipos de estímulos que podem produzir sobressalto, como trânsito de carros, motos e bicicletas, encostas íngremes, e encontros com outros animais. Cavalos são animais essencialmente nervosos, característica que pode ser relacionada a história destes animais como presas; desta forma o encontro de algo estranho no caminho pode assusta-los e fazê-los mostrar comportamentos de esquiva. Esta situação pode representar grande perigo para o cavaleiro (MATSUURA, 2010). Outro ponto interessante é que por ser um modelo não invasivo, pode ser feito em cavalos atletas de alto padrão sem apresentar riscos ao animal ao seu desempenho em competições.

5.1.2. O efeito da acupuntura na alterações da VFC induzidas pelo estresse de sobressalto

O presente estudo demonstrou que no momento do estresse tanto no momento de ativação simpática quanto de ativação parassimpática, o grupo NP apresentou a maior FC média entre os grupos, seguido do grupo CTL e do grupo ACUP com valores ainda mais baixos. No entanto, foi apenas detectada diferença significativa entre ACUP e NP. Mostrando, dessa forma, apenas uma tendência a diminuição da FC no momento do estresse nos animais tratados com acupuntura.

Os resultados ainda demonstraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos nos parâmetros RMSSD (aumenta conforme o incremento da ativação vagal) e SDRR (quando aumenta indica menor ativação simpática). Sendo assim, esses resultados sugerem que a análise através do domínio do tempo não apresentaram diferença estatística em relação à ativação vagal e à ativação simpática separadamente, entre os grupos em nenhum momento do experimento.

No entanto observamos em nosso estudo, que a acupuntura reduziu significativamente a razão LF/HF no estresse no momento de predominante ativação parassimpática. Dessa forma, podemos sugerir que a acupuntura foi capaz de promover uma recuperação mais rápida dos animais tratados, já que os dados mostram uma tendência uma ativação parassimpática no grupo tratado com acupuntura em relação aos grupos NP e CTL, após o estímulo estressor de sobressalto.

Este método de análise das alterações na VFC induzidas por estresse onde o momento predominante simpático é separado do momento predominante parassimpático tem grande vantagem já que permite analisar estes momentos especificamente (KREIBIG, 2010). Muitas das vezes quando estes momentos são analisados em conjunto, o momento de ativação parassimpática se sobrepõe ao momento simpático e a razão LF/HF nos minutos seguintes pós estresse pode ter valores bem menores.

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 SDRR 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 grupos no momento do estresse em nosso estudo.

Estudos em humanos vêm demonstrando os efeitos benéficos do tratamento com acupuntura em diversas modalidades de estresse. Huang e colaboradores (2005) utilizando um único ponto de acupuntura (PC6) observou a modulação vagal representada pela ativação do HF e decréscimo dos valores da razão LF/HF. 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. Pavão e colaboradores (2009) demonstraram os efeitos da acupuntura nos pontos E36, F4 e BP6 em adultos jovens e idade avançada, 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. Outro estudo utilizou um protocolo clínico de acupuntura (pontos básicos: VG20, VG24, *Yintang*, F4, Pc6, E36 e R3) pra tratar indivíduos com histórico de estresse crônico. O estudo demonstrou uma redução significativa de diversos sintomas relacionados ao estresse nos indivíduos tratados com acupuntura, e ainda,

apresentaram menores valores de LF e da razão LF/HF, além de um maior valor de HF quando comparado ao grupo tratado com não pontos. (HWANG et al., 2011).

Estudos experimentais com animais também vêm demonstrando resultados satisfatórios da acupuntura em tratamento e controle do estresse. Imai e colaboradores (2009) estudaram os efeitos da acupuntura em ratos submetidos ao 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 2011, Godoy observou que a fármaco-acupuntura foi capaz de reduzir a FC média de equinos submetidos ao estresse de transporte rodoviário. Em estudo realizado com estresse sonoro em cães, a acupuntura promoveu redução do balanço simpato-vagal, reduzindo significativamente a razão LF/HF e a FC média, além de produzir redução das respostas comportamentais de luta e fuga características de estresse (MACCARIELLO, 2012).

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.

O efeito da acupuntura sobre a VFC de animais submetidos ao estresse pode estar relacionada a ação da acupuntura diretamente sobre o SNA e conseqüentemente sobre o sistema cardiovascular, ou indiretamente sobre as estruturas centrais relacionadas a ativação do simpato-adrenal. A ação direta da acupuntura sobre o sistema simpático foi sugerida em estudos com indivíduos saudáveis, onde acupuntura no ponto E36 promoveu uma redução significativa nas elevações na pressão arterial induzida pelo estresse, sendo estes efeitos principalmente relacionados a inibição simpática (MIDDLEKAUFF; YU; HUI, 2001). Por outro lado, a modulação do sistema cardiovascular pela acupuntura também tem sido relacionada a ativação de uma via neural de alça-longa que envolve o núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), a substância cinzenta periaqueductal ventrolateral (PAGvl) e o bulbo rostral ventrolateral (VLMr) (LI et al., 2002).

5.1.3. O efeito da acupuntura no estresse através da análise do Cortisol

Nossos resultados mostram que o grupo ACUP apresentou níveis de cortisol significativamente menores que o grupo CTL 30 minutos após o estresse. Outros autores também mostram que a acupuntura pode reduzir os níveis de estresse. Liao e colaboradores demonstraram que a acupuntura pode promover uma redução dos níveis de cortisol induzidos pelo estresse. No entanto, nossos resultados devem ser avaliados com cautela. Embora o estímulo de sobressalto tenha produzido um aumento dos níveis de cortisol, este aumento não foi significativo, o que nos leva a concluir que a acupuntura neste caso, não preveniu apenas o aumento do cortisol induzido pelo estresse e sim reduziu o cortisol abaixo dos níveis basais.

Reconhece-se que a quantidade de tensão psicológica que um animal encontra determina o grau de resposta do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) (CAYADO et al. 2006). O pico de cortisol tende a estar presente no plasma 15-30 minutos após um estímulo estressor real. O cortisol liga-se a uma globulina específica chamada transcortina no plasma (BERNE E LEVY, 1998). O cortisol não ligado, livre, é biologicamente ativo. O cavalo tem concentrações relativamente baixas deste globulina ligante do cortisol, assim, conseqüentemente um pequeno aumento no cortisol plasmático total que leva a um grande aumento no cortisol livre. A concentração de cortisol plasmático atingirá o pico aproximadamente 30 minutos após o estressor parar (FAZIO et al. 2008). No entanto, os resultados dos valores de cortisol obtidos em diferentes experimentos são bastante controversos, porque existe grande dificuldade de mensuração, já que a ligação do cortisol com sua proteína transportadora, a transcortina, não é linear (LASSOURD et al., 1996).

Estudos anteriores não conseguiram mostrar essa redução (GUIMARÃES et al., 1997; ANGELI & LUNA, 2008; GODOI, 2011). Segundo Luna e Taylor (1998) a acupuntura pode apresentar aumento ou diminuição das concentrações plasmáticas de cortisol no cavalo. Segundo Zheng (2008) isto acontece porque a acupuntura pode equilibrar as funções da tireóide e da adrenal, de modo a otimizar o nível dos seus hormônios. A acupuntura estimula a glândula adrenal a produzir mais cortisol, aumentando as suas funções, em vez de esgotar a sua como a cafeína faz. Quando os nossos corpos produzem cortisol demais para lidar com o estresse, a acupuntura reduz a produção de cortisol e reequilibra o corpo (ZHENG, 2008).

Uma hipótese para os nossos resultados é que a acupuntura tenha causado um relaxamento tão grande que pode ter se sobreposto ao estímulo de estresse. No entanto não

podemos afirmar já que não houve alteração do comportamental dos animais tratados pois estes não se apresentaram menos reativos ao estresse. Novos estudos devem verificar se a acupuntura pode alterar outros marcadores do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal como o ACTH e outros marcadores de estresse como a Prolactina para confirmar estes resultados.

5.1.4. O efeito da acupuntura no estresse através do Teste de Reatividade

Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos tanto em relação ao tempo de reação e resposta quanto em relação a distância percorrida, indicando que a acupuntura não foi capaz de atenuar a reação de sobressalto e fuga dos animais. O que difere de Guimarães e colaboradores (1997), que mostraram que a acupuntura pode atenuar o comportamento aversivo induzido pelo estresse agudo em ratos.

Não se tem estudos anteriores que relatam o efeito da acupuntura utilizando modelos experimentais de estresse agudo em equinos.

Embora tenhamos utilizado o parâmetro distância percorrida em nossa trabalho, acreditamos que este não foi eficiente nas determinações das variações de deslocamento que poderiam ser alteradas pela acupuntura, já que a distância percorrida foi calculada a partir da diferença entre a posição final e a posição inicial do equinos, não levando em consideração o movimentos de curva feito pelos animais.

5.2. EXPERIMENTO 2: Efeito da acupuntura no estresse em equinos submetidos a Reprise de Adestramento: TESTE A CAMPO

5.2.1. A reprise de adestramento como modelo de estresse

Exercício representa um estresse físico que desafia a homeostase. O seu efeito indubitável benéfico sobre a saúde do corpo tem sido comprovado em numerosos estudos científicos. No entanto, o exercício representa uma perturbação ou, até mesmo, uma condição de estresse, uma vez que altera muitos sistemas para se adaptar a uma nova condição (CAYADO et al, 2006).

Reconhece-se que a quantidade de tensão psicológica que o animal encontra-se determina o grau de resposta do eixo HPA. Em atletas, o estresse emocional da competição é um elemento importante na resposta adrenal (SUINN, 2005). No entanto, o efeito estressor da competição no desempenho de cavalos permanecem por ser elucidados (CAYADO at al, 2006).

Cayado e colaboradores (2006) sugerem que cavalos envolvidos em competição são um bom modelo para o estudo da resposta ao estresse induzida pelo exercício e que esse modelo pode ser utilizado em pesquisas futuras em busca de novos fármacos ansiolíticos ou mesmo conduzir à descoberta de moléculas endógenas ansiolíticas em cavalos.

A escolha da modalidade hípica como modelo experimental de estresse ocorreu devido a sua principal característica de ter como objetivo o animal flexível, calmo, atento. Portanto, espera-se um desenvolvimento harmônico do organismo do animal. Dessa forma, podemos considerar que adestramento é, dentre as outras modalidades, a que o estresse mais influência o desempenho atlético do equino.

A reprise provocou aumento significativo nos níveis de cortisol após 30 minutos que indica um efeito estressor. No entanto, apesar de apresentar um aumento, a razão LF/HF não estava significativamente aumentada 30 min após a reprise. O período de 30 minutos após reprise foi avaliado baseado nos resultados de Van Breda e colaboradores (2006). Neste estudo, com objetivo de avaliar o nível de estresse causado pelo adestramento em equinos foram observados aumentos significativos nos parâmetros de VFC 30 a 45 minutos pós-exercício (basal: LF = $87,86 \pm 9,48$; HF = $12,14 \pm 10,56$; LF/HF = $1,8 \pm 0,7$ e 30 a 45 minutos pós-exercício: LF = $98,83 \pm 12,1$; HF = $23,09 \pm 9,1$; LF/HF = $11,07 \pm 6,4$). No entanto, nesse estudo a atividade física era mais longa que a reprise (75 ± 17 min *versus* 6 minutos) (VAN BREDA, 2006). Em outro estudo em que se foi comparado o nível de estresse de equinos que cavalgavam em posição de líder (posicionado a frente) com os equinos seguidores (posicionado atrás do cavalo líder), a VFC foi analisada aos 30, 60 e 90 minutos após o exercício (MATSUURA, 2010), apresentando também uma atividade física mais longo (60 minutos).

A performance avaliada pelos juízes e cavaleiros é interessante. Pode ser utilizada para analisar estratégias de redução de estresse/ melhora da performance. Porque embora seja uma análise subjetiva, é utilizada na prática, sendo o único método de avaliação nesta modalidade.

5.2.2. Acupuntura na reprise de adestramento

Nossos resultados demonstram que acupuntura foi capaz de reduzir significativamente a razão LF/HF 30 minutos após a reprise de Adestramento, evidenciando que os animais quando tratados apresentaram uma melhor recuperação. Observamos também que houve um aumento significativo do componente de alta

frequência (LF) e uma diminuição significativa do componente de baixa frequência (HF) nos animais não tratados (CTL), 30 minutos após a reprise de adestramento. O HF corresponde as variações da FC relacionadas com a modulação parassimpática e o LF reflete predominantemente a atividade simpática. Fatores determinantes para o aumento da LF podem ser observados durante o exercícios moderados, estresse mental e atividade física (HOSHI, 2009; VANDERLEI et al., 2009). A literatura científica afirma que a banda de baixa frequência representa a atividade do Sistema Nervoso Simpático, ao contrário da banda de alta frequência que representa exclusivamente a atividade vagal para o coração (KAREMAKER & LIE, 2000). Dessa forma, podemos observar que 30 minutos após a reprise os animais não tratados com acupuntura ainda apresentavam a predominância do atividade simpática. Enquanto que os animais tratados com acupuntura já apresentavam recuperados, em equilíbrio simpato-vagal, com valores de LF e HF retornando praticamente aos valores basais encontrados.

No entanto, a acupuntura não previniu o aumento dos níveis de cortisol nos 30 minutos após a reprise, como sugerido por Luna & Taylor (1998) em equinos e não ocorreu a inibição da elevação da concentração de cortisol pós exercício, como observado por Akimoto e colaboradores (2003).

Outros estudos não conseguiram mostrar essa redução ou inibição da elevação dos níveis de cortisol (GUIMARÃES, 1997; ANGELI & LUNA, 2008; GODOY, 2011). Nossos resultados corroboram, com Angeli & Luna (2008) que não houve diferença significativa nos níveis de cortisol de equinos submetidos a corrida, quando tratados com aquapuntura.

Segundo Kaada (1993), acupuntura está cada vez mais sendo utilizada no meio esportivo por apresentar resultados imediatos e não serem considerados como doping. Este autor aponta ainda que existe a suspeita de que as corredoras chinesas tenham empregado a acupuntura como um dos métodos para justificar a excelente performance obtida nas competições internacionais dos últimos anos. O autor apresenta um estudo conduzido praticamente há duas décadas, que mostra um significativo aumento no desempenho dessas atletas após o uso do TENS de baixa frequência (2Hz), em atletas que competem em natação, corrida e ciclismo. Por sua vez Akimoto e colaboradores (2003) estudaram uso da acupuntura e as respostas do sistema endócrino e imunológico durante competições de futebol feminino e associaram com as respostas ao POMS (Profile of Mood States), instrumento de avaliação de estados emocionais. O grupo experimental recebeu estimulação com acupuntura nos pontos IG4, E36, E6 e P6 por 15 minutos, todas as noites

após os jogos ao longo do campeonato. Os resultados apontaram que embora o exercício induza a um aumento do cortisol, no grupo que recebeu tratamento com acupuntura houve um decréscimo desse indicador e uma modulação dos índices do POMS, o que leva à conclusão de que a acupuntura é um suporte efetivo para o bem estar físico e mental de atletas (AKIMOTO et al., 2003).

No presente estudo, não houve alteração do desempenho de equinos ao serem tratados com acupuntura. No entanto, na avaliação técnica foi observado uma pequena tendência a melhora do desempenho nos animais tratados. Pois se tratando desse tipo de modalidade, onde diferenças mínimas e detalhes sutis podem levar a vitória ou derrota de um conjunto, podemos considerar esse resultado. Outro fator importante, e que existe uma interferência muito grande do cavaleiro. Tanto o cavalo quanto o cavaleiro devem estar confiantes e entrosados para efetuar a figura já que havendo um pequeno erro também do cavaleiro, qualidade do movimento fica comprometida prejudicando a pontuação.

Não existem pesquisas anteriores sobre o efeito da acupuntura no desempenho de equinos na modalidade Adestramento. No entanto, Angeli & Luna (2008) embora não tenham conseguido demonstrar a via de efeito da aquapuntura sobre a performance de equinos atletas, puderam observar a melhora de resultados alcançados por cavalos de corrida, após protocolo de tratamento prolongado, com duração de 3 semanas sendo 2 tratamentos semanais nos pontos Baihui, VB27, E30, BP13.

Vale ressaltar que os resultados obtidos foram a partir de apenas uma sessão de acupuntura imediatamente antes da reprise. Erlich & Haber (1992) demonstraram aumento significativo na capacidade atlética de atletas humanos tratados com sessões semanais de acupuntura, durante 5 semanas. Karvelas e colaboradores (1996) não encontraram diferença nos parâmetros fisiológicos em humanos após único tratamento com acupuntura. Estes trabalhos sugerem que necessidade de fazer-se mais de um tratamento para que haja alguma resposta de melhora fisiológica de melhora de performance de atletas humanos. Portanto, em estudos futuros outros protocolos mais intensos de acupuntura devem ser usados.

Não foi observado correlação em nenhum parâmetro, apenas entre a avaliação técnica e avaliação do conjunto realizada pelos juízes. A performance geral na prova depende de vários fatores, como o animal estar num bom dia, treinamento individual como também a influência da técnica do cavaleiro sobre o animal. Observamos também que a VFC e o cortisol não se correlacionam com a performance. Dessa forma, novos estudos

precisam ser realizados com o objetivo de verificar quais parâmetros fisiológicos podem estar relacionados a melhor performance atlética nesta modalidade hípica.

Este estudo apresentou algumas limitações. A necessidade de ter um grupo o mais homogêneo possível fez com que ficássemos com um número muito reduzido de animais. Ou seja, animais da mesma modalidade, com o mesmo treinamento e o mesmo nível de desempenho. No entanto, existem diferenças individuais mesmo que sutis, que podem interferir na avaliação do desempenho na prova. Por este motivo decidimos utilizar os mesmos animais, sendo um dia como controle (sem tratamento) e no outro dia os mesmos animais tratados com acupuntura. Como no comportamento humano, é corretamente justificado afirmar que cada cavalo tem uma abordagem individual para lidar com o estresse e assim cada cavalo vai se comportar de uma maneira diferente ao ser exposto ao mesmo estressor. Ou seja, os animais respondem de maneiras diferentes a uma mesma situação, ou seja, que pode ser estressante para um pode não ser para outra. Assim, embora um cavalo possa ter reagido de "uma maneira individual", ele se comporta dessa maneira durante os treinamentos e competições. Dessa forma, cada cavalo serviu como seu próprio controle.

5.3. Considerações Finais

Os resultados apresentados no presente estudo reforçam e acrescentam evidências de que a acupuntura promove alteração na regulação do sistema nervoso autônomo (VOGEL, 2005). Vários autores como Agelink et al (2003), Huang et al (2005), Nishijo et al (1997) e Li et al (2005) encontraram em suas pesquisas alterações da modulação autonômica com o aumento da atividade parassimpática. O aumento do índice de modulação vagal cardíaca e a diminuição da frequência cardíaca de indivíduos saudáveis levam a conclusão que a acupuntura é um potencializador do sistema vagal.

Comprovando as expectativas e resultados já encontrados, o presente estudo conseguiu realizar mudanças no sistema autonômico decorrentes de estímulos estressores utilizando a acupuntura como tratamento. Além disso, a acupuntura parece modular o eixo HHA, embora ainda permaneçam dúvidas que ainda devem ser esclarecidas, necessitando de outras investigações para melhor elucidação.

Dessa forma, podemos sugerir que a prática regular por um período prolongado de tratamento com acupuntura com o objetivo de promover uma potencialização do sistema parassimpático, talvez possa promover uma melhora da imunidade e conseqüentemente a

diminuição de doenças relacionadas ao estresse e, ainda, uma possível prevenção de doenças cardiovasculares, comumente presente nesses animais. Estudar a incidência dessas doenças em animais regularmente tratados com acupuntura pra investigar se o tratamento possui esse efeito é uma sugestão que deve ser vista como futuros trabalhos.

6. CONCLUSÃO

- O modelo de estresse agudo de sobressalto (abertura abrupta de um guarda-chuva) produziu um aumento significativo na razão LF/HF, na FC e reação de sobressalto sugerindo que o modelo se mostrou eficaz, podendo ser utilizado em estudos futuros relacionados ao estresse.
- Uma sessão de acupuntura nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 imediatamente antes do estresse de sobressalto foi capaz de reduzir significativamente as respostas autonômicas e endócrinas (razão LF/HF no momento de ativação parassimpática e os níveis de cortisol 30 minutos pós estresse), indicando uma recuperação mais rápida e um efeito anti-estresse da acupuntura.
- O tratamento realizado em não pontos não produziu nenhum efeito sobre os parâmetros estudados.
- A reprise de Adestramento foi capaz de aumentar os níveis de cortisol após 30 minutos se mostrando um bom modelo de estresse.
- Apenas uma sessão de acupuntura nos pontos VG1, VG20, C7 e B52 imediatamente antes da reprise de adestramento reduziu a razão LF/HF, promovendo uma recuperação mais rápida dos animais e uma sutil melhora do desempenho técnico.
- Dessa forma, nossos dados sugerem que a acupuntura constitui uma terapia promissora no controle do estresse em equinos. Mas ainda se faz necessário mais estudos com protocolos mais intensos e outros parâmetros para elucidar os mecanismos fisiológicos associados a esta melhora.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGELINK, M.W.; SANNER, D.; EICH, H.; PACH, J.; BERTILING, R.; LEMMER, W.; KLIESER, E.; LEHMANN, E.. Does acupuncture influence the cardiac autonomic nervous system in patents with minor depression on onxiety disorders? **Fortschr Neurol Psychiatr**, v.71, p. 141-149. 2003.
2. ALEXANDER, S.L., IRVINE, C.H.G., ELLIS, M.J., DONALD, R.A. The effect of acute exercise on the secretion of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and adrenocorticotropin as measured in pituitary venous blood from the horse. **Endocrinology**, v. 128, p. 65–72. 1991.
3. AKIMOTO T, NAKAHORI C, AIZAWA K, KIMURA F, FUKUBAIASHI T, KONO I. Acupuncture and responses of immunologic and endocrine markers during competition. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.35, n.8, p. 1296-302. 2003.
4. ANGELI, A.L.. Acupuntura aplicada à medicina esportiva equina. **Monografia**. Curso de Especialização em Acupuntura Veterinária, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP. 2004.
5. ANGELI, A.L.; LUNA, S.P.L.. Aquapuncture Improves Metabolic Capacity in Thoroughbred Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, p.525-531. 2008.
6. ANGELI, A.L.; LUNA, S.P.L.; GAROTTI, J.R.. Aquapuntura no tratamento das síndromes equinas: há efeito sobre os valores hematológicos e de cortisol?. **Ars veterinaria, Jaboticabal**, SP, v.24, n.3, p. 153-160. 2008.
7. BERNARD, L. C., KRUPAT, E..Health Psychology: Biopsychosocial Factors in Health and Illness. New York: **Harcourt Brace College Publishers**. 1994.
8. BLECHA, F. Immune system response to stress. **CABI Publishing**, p.111-122. 2000.
9. BAEK, Y.H., HUH, J.E., LEE, J.D., CHOI, Y., PARK, D.S. Antinociceptive effect and the mechanism of bee venom acupuncture (apipuncture) on inflammatory pain in the rat model of collagen-induced arthritis: mediation by alpha2- Adrenoceptors. **Brain Res**, v. 305, n. 10, p. 1073-1074. 2006
10. BAGSHAW, C.S., RALSTON, S.L., FISHER, H.. Behavioral and physiological effect of orally administered tryptophan on horses subjected to acute isolation stress. **Appl. Anim. Behav. Sci.** v. 40, n. 1, p. 1–12. 1994.
11. BORELL, E.V; LANGBEIN, J; DESPRÉS, G; HANSEN, S; LETERRIER, C; MARCHANT-FORDE, J; MARCHANT-FORDE,R; MINERO, M; 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. **Physiology & Behavior**, v. 92, p.293–316. 2007.
12. BRENDA, E.V., A Nonnatural Head–Neck Position (Rollkur) During Training Results in Less Acute Stress in Elite, Trained, Dressage Horses. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 9, n. 1, p. 59–64. 2006.
13. BUCHHEIT, M; GINGRE, C. Cardiac parasympathetic regulation: respective associations with cardiorespiratory fitness and training load. **AM. J. Physiol**, v. 291, p. 451-458. 2006.

14. CAYADO, P.; MUNOZ-ESCASSI, B.; DOMÍNGUEZ, C.; MANLEY, W.; OLABARRI, B.; SANCHEZ DE LA MUELAS, M.; CASTEJON, F.; MARANON, G.; VARA, E.. Hormone response to training and competition in athletic horses. **Equine vet. J. Suppl.** v. 36, p. 274-278. 2006.
15. CHANG, Y.H., HISEH, M.T., WU, C.R. Effect of acupuncture at bai-hui on the deficit of memory storage in rats. **Am J Chin Med**, v. 27, p. 289-298. 1999.
16. CHROUSOS, G.P., LORIAUX, D.L., GOLD, P.W. Mechanisms of physical and emotional stress. **Adv Exp Med Bio**, v.245, p. 3-11. 1988.
17. CLARK, D.K., FRIEND, T.H., DELLMEIER, G.. The effect of orientation during trailer transport on heart rate, cortisol and balance in horses. **Appl. Anim. Behav. Sci.** v. 38, p. 179–189. 1993.
18. COLBORN, D.R., THOMPSON, D.L. Jr., ROTH, T.L., CAPEHART, J.S., WHITE, K.L.. Responses of cortisol and prolactin to sexual excitement and stress in stallions and geldings. **J. Anim. Sci**, v. 69, p. 2556–2562. 1991.
19. CREGIER, S.E..Reducing equine hauling stress: a review. **J Equine Vet.Sci.**, v.2 , p.186-198. 1982.
20. CHRISTENSEN, J.W., ZHARKIKH, T., CHOVAUX, E.. Object recognition and generalisation during habituation in horses. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 129, p. 83–91. 2010.
21. COVALESKY, M. E.; RUSSONIELLO, C. R.; MALINOWSKI, K. Effects of show-jumping performance stress on plasma cortisol and lactate concentrations and heart rate and behavior in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v.12, n. 6, p.244-251. 1992.
22. DARELLA, M.L. A atividade mental segundo o modelo da Medicina Tradicional Chinesa. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção – Centro Tecnológico. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2001.
23. DRAEHMPAEHL, D.; ZOHMANN, A. Acupuntura no cão e no gato – **Princípios básicos e prática científica**. São Paulo: Roca, p.245. 1997.
24. DEVRIES, A.C.K.S, CRAFT, T.K.S, GLASPER, E.R, NEIGH, G.N, ALEXANDER, J.K.. Social influences on stress responses and health. **J. Psyneuen**, v.32, p. 587-607. 2007.
25. DICKSON, W.M. Endocrinologia, reprodução e lactação. Glândulas endócrinas. In: SWENSON, M.J. Dukes:**Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 571-602. 1996.
26. DOBROMYLSKYJ, P., P. A. FLECKNELL, B. D. LASCELLES, H. LIVINGSTON, P. TAYLOR, AND A. WATERMAN-PEARSON. Pain assessment. In: Flecknell, P.A. (eds), **Pain Manag An**, p. 53–79. W.B. Saunders, London, UK. 2000.
27. DOUGLAS, R. Circadian cortisol rhythmicity and equine cushing´s-like disease. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.19, n.11, p.684-753, 1999.
28. EHRLICH, D.; HABER, P.. Influence of acupuncture on physical performance capacity and haemodynamic parameters. **Int. Sports Med**, v.13, p.486-491. 1992.

29. FRANCI, C.R. Estresse: Processos adaptativos e não adaptativos. In: ANTUNES-Rodrigues, F., et al. **Neuroendocrinologia Básica Aplicada**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.200-223. 2005.
30. GODOI, T.L.O.S. Influência da farmaco-acupuntura nas respostas de estresse de equinos durante o transporte rodoviário. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2011.
31. GÓRECKA, A.; BAKUNIAK, M.; CHRUSZCZEWSKI, M.H.; JEZIERSKI, T. A.. A note on the habituation to novelty in horses: handler effect. **Science Animal Papers and Reports** vol, v. 25, no. 3, p. 143-152. 2007
32. GRAVESEN, J.; LASSEN, B.; MELNIK, R.; PICASSO, B.; PICHÉ, R.; RADULOVIC, N.; WANG, L.X.. Determination of distance from a 2D Picture. **Journal of Physics.: Conf. Ser**, p. 52-46. 2006
33. GUYTON, A.C., HALL, J.E.. Tratado de Fisiologia Médica. 9ªed. Editora Guanabara: Koogan S.A, Rio de Janeiro. Cap. 77, p.876-878. 1997.
34. GUIMARÃES, C.M., PINGE, M.C.M., YAMAMURA, Y., MELLO L.E.A.M.. Effects of acupuncture on behavioral, cardiovascular and hormonal responses in restraint-stressed Wistar rats. **Braz J Med Biol Res**, v.30, n.12, p.1445-50. 1997.
35. HADA, T., ONAKA, T., TAKAHASHI, T., HIRAGA, A., YAGI, K., Effects of Novelty Stress on Neuroendocrine Activities and Running Performance in Thoroughbred Horses. **Journal of Neuroendocrinology**, v.15, p. 638-648. 2003.
36. HARMAN, J. C. Backs, performance and acupuncture. In: **Annual convention of the American association of equine practitioners**, v. 39, p. 337-348. 1993.
37. HARMAN, J. C. Complementary (alternative) therapies for poor performance, back problems and lameness. In: ANGELI, A.L.. Acupuntura aplicada à medicina esportiva equina. **Monografia**. Curso de Especialização em Acupuntura Veterinária, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, SP. 2004.
38. HENNEMAN, K.. Traditional chinese medicine and biomechanics in the performance horse. 2001 In:_____. ANGELI, A.L., JOAQUIM, J.G.F., LUNA, S.P.L.. Acupuntura aplicada à medicina esportiva equina. **Revista Acadêmica Curitiba**, v. 5, n. 3, p. 325-333, 2007.
39. HOSHI, R. A.. Variabilidade da frequência cardíaca como ferramenta de análise da função autonômica: revisão de literatura e comparação do comportamento autonômico e metabólico em recuperação pós-exercício. **Dissertação**. Unesp. 2009
40. HOUP, K.A.; McDONNELL, S.M. Equine Stereotypies. **Compendium On Continuing Education For The Practicing Veterinarian**, v.15, n.9, p.1265-1271. 1993.
41. HUANG, S.T.; CHEN, G.Y.; LO, H.M.; LIN, J.G; LEE, Y.S; KUO, C.D.. Increase in the vagal modulation by acupuncture at Neiguan point in the healthy subjects. **Am. J. Chin. Med**, v.33, p. 157-164. 2005.
42. 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.

43. IRVINE, C.H.G., ALEXANDER, S.L..Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. **Domest. Anim. Endocrinol**, v. 11, p. 227–238. 1994.
44. JANG, M.H., SHIN, M.C., LEE, T.H., LIM, B.V., SHIN, M.S., MIN, B.I., 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. **Neurosci. Lett**. v. 347, p. 5-8. 2003.
45. JORGENSEN, G.H.M; LISTOL, S.H.O.; BOE, K.E.. Assessment of stress level in horses during competition using salivary cortisol. **Journal of Veterinary Behaviour**, v. 5, n. 4. 2010.
46. KAADA B The Chinese runners' revolution. Tidsskr Nor Laegeforen 1993. IN: MOREIRA, F.G. & RUBIO, k.. A dor em corredores com fascite plantar: o uso da acupuntura the pain in runners with fasciitis: the use of acupuncture. **Rev. Dor**, p.1290-1296, 2008
47. KANEKO, J.R.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. (1997) Clinical biochemistry of domestic animal. 5 ed. San Diego, Academic Press. 932p. IN: FILHO, J.D.R.; DANTAS, W.M.F.; ALVES, G.E.S..Cortisol sérico de equinos com compactação experimental no cólon maior tratados com hidratações enteral e parenteral. **Rev. Ceres**, v.58, n.3. 2011
48. KARVELAS, B. R.; HOFFMAN, D.; ZENI, A.I.. Acute effects of acupuncture on psychological responses to cycle ergometry. Arch. Phys. **Med. Rehabil**, v. 77, n.12, p. 1256-1259. 1996.
49. KAREMAKER, J.M.; LIE, K.I.. Heart rate variability: a telltale of health or disease. **Eur. Heart J**, v.21, n.6, p. 435-437. 2000.
50. KEELING, L., P. JENSEN, P.. Behavioral disturbances, stress and welfare. In: Jensen, P. (eds), The Ethology of Domestic Animals: An Introductory Text. **CABT Publishing**, p. 79–98. 2002.
51. KILEY-WORTHINGTON, M., 1990. The behavior of horses in relation to management and training towards ethologically sound environments. **Equine Vet. Sci**, v.10, 62–71. 1990.
52. KIM, H.W., KWON, Y.B., HAM, T.W., ROH, D.H., YOON, S.Y., LEE, H.J., HAN, H.J., YANG, I.S., BEITZ, A.J., LEE, J.H. Acupoint stimulation using bee venom attenuates formalin-induced pain behavior and spinal cord Fos expression in rats. **J Vet Med Sci**, v. 65, p. 349-355. 2003.
53. KOCH, M..The neurobiology of startle. **Progress in Neurobiology**, v. 59, p. 107-128. 1999.
54. KREIBIG, S.D.. Autonomic nervous system activity in emotion: a review. **Psychol**, v.84, p. 394-421. 2010.
55. LEE, J.D., PARK, H.J., CHAE, Y., LIM, S. An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. **Evid Based Compl Alternat Med**, v. 2, p.79–84. 2005.
56. LI, Z.; WANG, C.; MAK, A.F.T.. Effects of acupuncture on heart rate variability in normal subjects under fatigue and nonfatigue state. **Eur. J. Appl. Physiol**, v.94, p.633-640. 2005.
57. LIAO, Y.Y..Effect of Acupuncture on Adrenocortical Hormone Production: I. Variation in the Ability for Adrenocortical Hormone Production in Relation to the Duration of Acupuncture Stimulation. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.7, p. 362-371. 1979.
58. LIMEHOUSE, J.B.; TAYLOR-LIMEHOUSE, P.A.. Conceitos Orientais da Acupuntura. In: SHOEN, A. M.. **Acupuntura Veterinária**. 2 ed. São Paulo:ROCA, cap.6, p.76-90. 2006.

59. LUNA, S.P.L. Equine opioid, endocrine and metabolic responses to anaesthesia, exercise, transport and acupuncture. CambridgeTese (PhD) – Universidade de Cambridge. 1993.
60. LUNA, S.P.L.; ANGELI, A.L.; FERREIRA, C.L.; LETTRY, V.; SCOGNAMILLO-SZABO, M. Comparison of Pharmacopuncture, Aquapuncture and Acepromazine for Sedation of Horses. **eCAM**, v. 5, n.3, p. 267–272. 2008.
61. MACCARIELLO, C.E.M. Efeitos da acupuntura na variabilidade da frequência cardíaca e no comportamento em cães submetidos ao estresse sonoro agudo. **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.
62. MACIOCIA, G. **Fundamentos da medicina chinesa**. São Paulo: ROCA, p. 658. 1996.
63. MAL, M.E., FRIEND, T.H., LAY, D.C., VOGELSANG, S.G., JENKINS, O.C.. Physiological responses of mares to short-term confinement and isolation. **J. Equine Vet.Sci**, v. 11, p. 96–102. 1991.
64. MANM, F.. Acupuntura: a antiga arte chinesa de curar, São Paulo: **Hermus**, p.208. 1971.
65. 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.
66. MARQUES, A.H, SILVERMAN, M.N. M., 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.
67. MARTINEZ, R., GODOY, A., NARETTO, E., WHITE, A.. Neuroendocrine changes produced by competition stress on the Thoroughbred race horse. **Compendium of Biochemical Physiology**, v. 3, p. 599–602. 1988.
68. MARGIS, R.; PICON, P.; COSNER, A. F.; SILVEIRA, R. O. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. **Revista de Psiquiatria**, v. 25, p. 65-74. 2003.
69. Manual HRV analyses: http://kubios.uef.fi/media/Kubios_HRV_2.1_Users_Guide.pdf
70. MATSSURA, A.; TANAKA, M.; IRIMAJIRI, M.; YAMAZAKI, A.; NAKANOWATARI, T.; HODATE, K.. Heart rate variability after horse trekking in leading and following horses. **Animal Science Journal**, v. 81, p. 618–621. 2010.
71. McEWEN, B. S. Stress and hippocampal plasticity. **Annu. Rev. Neurosci**, v. 22, p. 105–122, 1999.
72. McEwen, B. Stress, definition and concepts. In Encyclopedia of Stress. G. Fink, ed. Academic Press. San Diego, p. 508-509. 2000.
73. McGREEVY, P. *Equine behavior: a guide for veterinarians and equine scientists*. Londres. Saunders, p. 357. 2004.
74. McCUE, P.M. Equine Cushing's disease. **The Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.18, n.3, p. 533-543, 2002.

75. MIDDLEKAUFF, H.R., YU, J.L., HUI, K. Acupuncture effects on reflex responses to mental stress in humans. **Am J Physiol Reg Integrat Comp Physiol**, v. 280, p. 462-468. 2001.
76. MORBEG, G.P.. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: MORBEG, G.P. & MENCH, J.A.. The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare. **CABI Publishing**, p. 1-22. 2000.
77. 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.
78. NICOL, C.J., BADNELL-WATERS, A.J., BICE, R., KELLAND, A., WILSON, A.D., HARRIS, P.A..The effects of diet and weaning method on the behaviour of young horses. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 95, p. 205–221. 2005.
79. NISHIJO, k.; MORI, H.; YOSIKAWA, K.; YAZAWA, K.. Decreased heart rate by acupuncture stimulation in humans via facilitation of cardiac vagal activity and suppression of cardiac sympathetic nerve. **Neurosci. Lett.**, v.227, p.165-168. 1997.
80. OHMURA, H.; HIRAGA, A.; AIDA, H.. Changes in heart rate and heart rate variability in Thoroughbreds during prolonged road transport. **Am. J. Vet. Res.**, v. 67, p. 455–462. 2006.
81. PALME, R., MÖSTL, E., Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. Proceedings, **1st Intern. Symposium Physiology and Ethology of Wild and Zoo Animals**, Berlin, Germany, p. 84. 1996.
82. PALME, R., MÖSTL, E., Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. **Int. J. Mammal. Biol.** v.62, p. 192–197. 1997.
83. PARK, H.J., LIM, S., LEE, H.J., 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. **Neurosci. Lett.** v. 319, p. 153-156. 2002.
84. PELL, S.M.; MCGREEVY, P.D. A study of cortisol and beta-endorphin levels in stereotypic and normal thoroughbreds. **Applied Animal Behaviour Science**, v.64, n.2, p.81-90. 1999.
85. PASCHOAL, M.A, VOLANTI, V.M, PIRES, C.S, FERNANDES, F.C. Variabilidade da Frequência Cardíaca em Diferentes Faixas Etárias. **Rev. Bras. Fisioter.**, v. 10, n. 4, p. 413-419. 2006.
86. REDONDO, A.R; CARRANZA. J; TRIGO, P. Fat diet reduces stress and intensity of startle reaction in horses. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 118, p. 69-75. 2009
87. RIETMANN, T. R.; STAUFFACHER, M.; BERNASCONI, P.; AUER, J. A.; WEISHAUPT, M. A.The Association between Heart Rate, Heart Rate Variability, Endocrine and Behavioural Pain Measures in Horses Suffering from Laminitis.**J. Vet. Med.** ,v. 51 A, p.218–225. 2004a.
88. RIETMANN, T.R., STUART, A.E.A., BERNASCONI, P., STAUFFACHER, M., AUER, J.A., WEISHAUPT, M.A. Assessment of mental stress in warmblood horses: heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters. **J. Appl. Anim. Welf.Sci**, v.88,p. 121–136. 2004b.

89. RUSHEN, J., 1986. Some problems with the physiological concept of 'stress'. **Aust. Vet. J.**, v. 63, p. 359–361. 1986.
90. RUEDIGER, H.; SEIBT, R.; SCHEUCH, K.; KRAUSE, M.; ALAM, S.J. Sympathetic and parasympathetic activation in heart rate variability in male hypertensive patients under mental stress. **Hum Hypertens**, v.18, p. 307-315. 2004
91. SCHATZMANN, U.. Practical analgesic treatment in horses. In: Hellebrekers, L. J. (eds), **Animal Pain**. p. 161–179. 2000.
92. SCHMIDT, A., AURICH, C., NEUHAUSER, S., AURICH, J., MÖSTL, E., Comparison of cortisol levels in blood plasma, saliva and faeces of horses submitted to different stressors or treated with ACTH. IN Symposium Equitation Science, 5, Sydney, 2009, Proceeding, p. 53. 2009.
93. SCHMIDT, A.; AURICH, C., S., MÖSTL, E ; MULLER, J.; AURICH, J.. Changes in cortisol release and heart rate and heart rate variability during the initial training of 3-years-old sport horses. **Hormones and Behavior**, v. 58, p. 628-636. 2010.
94. SCHMIDT, A., BIAU, S., MÖSTL, E., BECKER-BIRCK ,M., MORILLON, B., AURICH, J., FAURE, J.M., AURICH, C..Changes in cortisol release and heart rate variability in sport horses during long-distance road transport.**Domestic Animal Endocrinology**, v. 38, p.179–189. 2010.
95. SCHOEN, A.M.. Acupuntura Veterinária – Da Arte Antiga à Medicina Moderna. 2ª Ed. São Paulo. Roca. 2006.
96. SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p.32. 1936.
97. SHANAHAN, S.. Trailer Loading Stress in Horses:Behavioral and Physiological Effects of Nonaversive Training (TTEAM). **J App An welfare Sci**, v.6, n.4, p.263–274. 2003.
98. SUINN, R.M.M.. Behavioral intervention for stress management in sports. **J. Stress Management**, v. 12, p. 343-362. 2005.
99. TEIXEIRA, P. P. e PADUA, J. T. – Avaliação dos níveis de cortisol, tiroxina, triiodotironina e glicose como indicativos de estresse em cavalos puro sangue inglês de corrida, antes e após a competição.**Ciência Animal Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 39-48. 2002.
100. TIRGOVISTE, C.I.. Anatomic and functional particularities of skin areas used in acupuncture. **Am J Acupunct**, v. 3, p.199-206. 1975.
101. TORRO, C. A. Atlas prático de acupuntura do cão. São Paulo: Livraria Varela, p.185. 1997.
102. ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, L. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature Reviews Neuroscience**, v.10, p. 397-409. 2009.
103. VANDERLEI, L. C. M., PASTRE, C.M., HOSHI, R.A., CARVALHO, T.D, GODOY, M.F. Noções Básicas de Variabilidade da Frequência Cardíaca e sua aplicabilidade Clínica. **Ver. Bras. Cir. Cardiovasc**, v. 24, n. 2, p. 205-217. 2009.
104. VISSER, E.K., REENEN, C.G., HOPSTER, H., SCHILDER, M.B.H., KNAAP, J.H., BARNEVELD, A., BKOHUIS, H.J.. Quantifying aspects of young horses's temperament: consistency of behavioural variable. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 74, p. 241–258. 2001.

105. VISSER, E.K., REENEN, C.G., WERF, J.T.N., SCHILDER, M.B.H., KNAAP, J.H., BARNEVELT, A., BLOKHUIS, H.J. Heart rate and heart rate variability during a novel object test and a handling test in young horses. **Physiology & Behavior**, v. 76, p. 289-296. 2002.
106. VISSER, E.K., ELLIS, A.D., REENEN, C.G.V. The effect of two different housing conditions on the welfare of young horses stabled for the first time. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 114, p.521–533. 2008.
107. VOGEL, J.H.K. Integrating complementary medicine into cardiovascular medicine: A report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents. **J. Am. Coll. Cardiol**, v.46, p. 184-221. 2005.
108. WALL, P.. Defining pain in animals_. In: Short, C., and A. van Poznak (eds), **Animal Pain**. Churchill Livingstone, NewYork, p. 63–79. 1992.
109. YAMAMURA ,Y. **Acupuntura-Tradicional :a Arte de Inserir**. Roca, São Paulo. 1993.
110. YANG, C.H., LEE, B., JUNG, H., SHIM, I., ROH, P., GOLDEN, G. Effect of acupuncture on response to immobilization stress. **Pharmacol Biochem. Behav.**, v. 72, p. 847-855. 2002.
111. 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. **Neurosci. Lett.**, v. 318, p. 85-88. 2002.
112. ZHENG, L.. Acupuncture and Hormone Balance. Edited by Iris M. Zhou, p. 48-49, 2008. **In: <http://books.google.com.br/books>**, p. 48-49. 2008.
113. ZHANG, A.L., WU, Y., JIANG, X.L.. Analysis on therapeutic effect of acupointinjection on chronic hepatitis B (Chinese). **Zhongguo Zhen Jiu**. v.25, p. 25–26. 2005.

8. ANEXOS

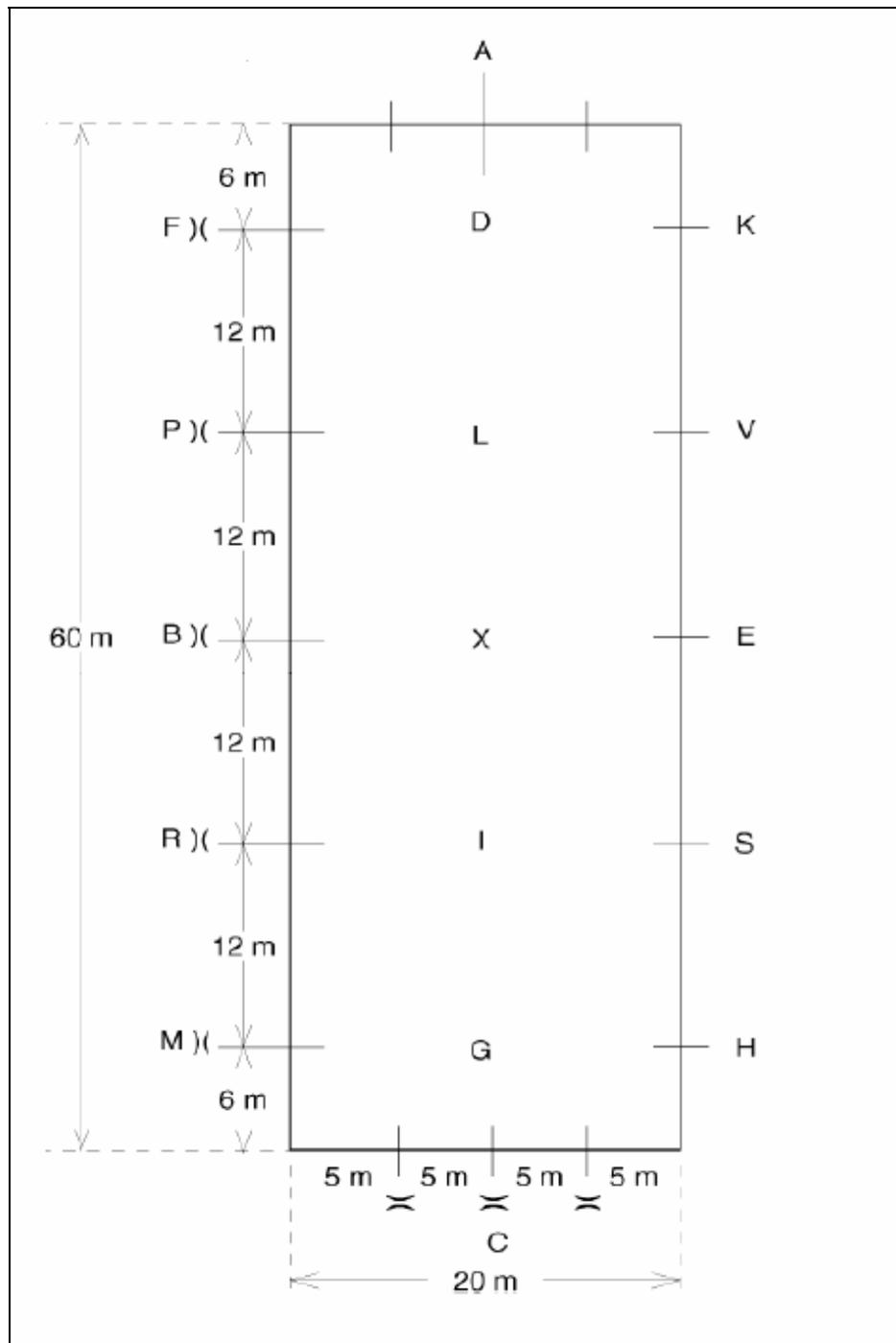
8.1. Ficha de Controle Individual do Experimento 1.

EXPERIMENTO 1: Estresse de Susto em Equinos (Guarda-Chuva)		DATA: _____
ANIMAL 01: _____		GRUPO: _____
HORÁRIO		
Esperado	Executado	
		Colocar o cabresto Colocar o frequencímetro, molhar e ativar Coletar Sangue (S1) Coletar Saliva (C1)
7:00		T₁ : Início Acupuntura
7:04		T₀ : Inserção da última agulha (Início contagem 20 minutos)
7:24		T₁ : Fim Acupuntura: Retirar as agulhas
X	X	Levar o cavalo para o picadeiro
7:30		T₂ : Entrada no Picadeiro
		Abertura do Guarda-Chuva (Estresse)
		Registro do comportamento (4 minutos)
X	X	Colocar o cabresto no cavalo
		Coleta de Sangue (S2) (5 min após Estresse)
X	X	Levar o cavalo para baia imediatamente após coleta
		Coleta sangue (S3) e Saliva (C2) (30 min após estresse)
		Coleta sangue (S4) e Saliva (C3) (30 min após estresse)

8.2. Ficha de Controle Individual do Experimento 2.

EXPERIMENTO 2: Estresse a Campo em Equinos: Reprise de Adestramento DATA: _____		
ANIMAL 01: _____ GRUPO: _____		
HORÁRIO		
Esperado	Executado	
		Colocar o cabresto Colocar o frequencímetro, molhar e ativar Coletar Sangue (S1) Coletar Saliva (C1)
		Encilhar
10:20		T-1: Início Acupuntura
10:24		T0: Inserção da última agulha (Início contagem 20 minutos)
10:44		T1: Fim Acupuntura: Retirar as agulhas
X	X	Levar o cavalo para a área ao redor do picadeiro
10:50		Aquecimento (10 min)
11:00		T2: Entrada no Picadeiro
		Início Reprise (6 min)
		Fim Reprise
X	X	Levar o cavalo para baia imediatamente e desencilhar
		Coleta sangue (S2) e Saliva (C2) (30 min após fim da reprise))

8.3. Esquema do picadeiro de adestramento



Fonte: Regulamento CBH, 2011

8.4. Modelo do questionário distribuído para os cavaleiros após a reprise.

QUESTIONÁRIO APÓS A REPRISE – CAVALEIROS											
Nome do Cavallo:						Data:					
Marcar com pontuação de 0 a 10, sendo:											
0	Nula										
1	Muito ruim										
2 a 3	Ruim										
4 a 5	Aceitável										
6 a 7	Boa										
8 a 9	Muito boa										
10	Ótima										
Flexibilidade	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Relaxamento	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentração/Atenção	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aceitação/obediência	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vontade	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

8.5. Ficha Avaliação dos Juízes Oficiais (CBH)



CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE HIPISMO

PRELIMINAR Nº 2 – Ed. 2007

Total máximo possível – 330 pontos

Tempo: 6:00 min

Todo trabalho ao trote é sentado quando não explícito na reprise.

GRAUS	MÓVIMENTOS	IDÉIAS DIRETIVAS	COEF	OBSERVAÇÕES
1. A X	Entrada ao trote de trabalho. Alto. Saudação. Partir ao trote de trabalho.	Retidão na linha do meio, qualidade do trote, alto e transições.		
2. C B E	Pista à direita. Pista à direita. Pista à esquerda.	Qualidade das entradas em C, B e E, qualidade do trote, retidão entre as entradas, encurvatura.		
3. A DR	Pela linha do meio. Cessão à perna à direita.	Retidão, equilíbrio, posição e fluência.		
4. M	Galope de trabalho no pé esquerdo.	Calma e fluência da partida, qualidade do galope.		
5. C	Círculo à esquerda de 15 m	Correção e dimensão do círculo, encurvatura, qualidade do galope.		
6. H-K	Alongar o galope.	O alongamento do pescoço e dos lances, regularidade do galope, retidão.		
7. Entre K e A	Galope de trabalho	Equilíbrio e definição da transição, qualidade do galope.		
8. FXH X	Mudar de mão. Trote de trabalho.	Retidão, qualidade do galope e do trote, equilíbrio e fluência da transição.		
9. MOK K	Alongar o trote elevado ou sentado. Trote de trabalho sentado.	O alongamento do pescoço e das passadas, regularidade do trote, equilíbrio e retidão, transições.		
10. A	Alto. Imobilidade de 5 seg. Partir ao passo médio.	Qualidade e imobilidade do alto, transições do trote para o alto e do alto para o passo, qualidade do passo médio.		
11. F-S	Passo livre.	Qualidade do passo livre e retidão.		
12. SHC	Passo médio.	Qualidade do passo médio.		
13.	Transição do passo livre para o passo médio em S.	Submissão ao encurtar as rédeas, mantendo a regularidade e a atividade do passo.		
14. C	Trote de trabalho	Equilíbrio e fluência da transição, qualidade do trote.		
15. B Antes de B B	Círculo de 20m à direita, no trote de trabalho elevado, permitindo que o cavalo alongue e abaixe o pescoço. Encurtar as rédeas. Trote de trabalho sentado.	Qualidade da extensão do pescoço, para frente e para baixo com leve contato, mantendo o equilíbrio e a qualidade do trote.		
16. A DS	Pela linha do meio. Cessão à perna à esquerda.	Retidão, equilíbrio, posição e fluência.		
17. H	Galope de trabalho no pé direito.	Calma e fluência da partida, qualidade do galope.		
18. C	Círculo à direita de 15m.	Execução e dimensão do círculo, encurvatura, qualidade do galope.		

19. M-F	Alongar o galope	O alongamento do pescoço e dos lances, regularidade do galope, retidão.	2	-
20. Entre F e A	Galope de trabalho	Equilíbrio e definição da transição, qualidade do galope.		
21. KXM X	Mudar de mão. Trote de trabalho.	Retidão, qualidade do galope e do trote, equilíbrio e fluência da transição.		
22. HXF F	Alongar o trote elevado ou sentado. Trote de trabalho sentado.	O alongamento do pescoço e da andadura, regularidade do trote, equilíbrio e retidão, transições.	2	
23. A X	Pela linha do meio. Alto. Saudação.	Qualidade do trote e da entrada em A, retidão na linha do meio, qualidade da transição e alto.		

Retirada ao passo em A, rédeas longas.

GRAUS DE CONJUNTO:	COEF	OBSERVAÇÕES
- ANDADURAS (franqueza e regularidade).	1	
- IMPULSÃO (desejo de mover-se para à frente, elasticidade dos lances, descontração do dorso e engajamento dos posteriores).	1	
- SUBMISSÃO (atenção e confiança; harmonia, leveza e facilidade dos movimentos, aceitação da embocadura e leveza do antebraço).	2	
- CAVALEIRO (posição e assento; correção e efeito das ajudas).	2	