

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

DISSERTAÇÃO

Influência da fármaco-acupuntura nas respostas de estresse de equinos durante o transporte rodoviário.

Tatianne Leme Oliveira Santos Godoi

2011



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

**INFLUÊNCIA DA FÁRMACO-ACUPUNTURA NAS RESPOSTAS DE
ESTRESSE DE EQUINOS DURANTE O TRANSPORTE RODOVIÁRIO.**

TATIANNE LEME OLIVEIRA SANTOS GODOI

Sob a Orientação da Professora
Magda Alves de Medeiros

e Co-orientação do Professor
Fernando Queiroz de Almeida

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
Agosto de 2011

636.10896

G588i

T

Godoi, Tatianne Leme Oliveira Santos, 1983-
Influência da fármaco-acupuntura nas
respostas de estresse de equinos durante o
transporte rodoviário / Tatianne Leme
Oliveira Santos Godoi - 2011.
43 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. 36-42.

1. Cavalo - Doenças - Tratamento -
Teses. 2. Cavalo - Efeito do stress -
Tratamento - Teses. 3. Acupuntura
veterinária - Teses. 4. Farmacologia
veterinária - Teses. 5. Cavalo - Transporte
- 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

TATIANNE LEME OLIVEIRA SANTOS GODOI

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 31/08/2011

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

Márcia Valéria Rizzo Scognamillo Szabó- Ph. D

Cesar Andrey Galindo Orozco. – Ph. D - UFRRJ

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

JÚLIA e CHIARA por toda ajuda durante a execução do experimento. E também pela amizade que surgiu e pela alegria de trabalhar ao lado de pessoas tão divertidas e verdadeiras.

A todos os FUNCIONÁRIOS E ESTAGIÁRIOS do Setor de Equinocultura.

Ao PROFESSOR NELSON MATOS, por disponibilizar a construção do embarcadouro, a liberação dos animais e o pagamento dos exames de anemia dos cavalos.

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

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

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

Ao meu co-orientador FERNANDO por aceitar o desafio do meu projeto e disponibilizar as fitas cardíacas do Exército Brasileiro.

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

RESUMO

GODOI, Tatianne Leme Oliveira Santos. **Influência da fármaco-acupuntura nas respostas de estresse de equinos durante o transporte rodoviário**. 2011. 43p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O transporte é um potencial fator de estresse para os equinos. 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 diminuir o potencial estressor do transporte em equinos. A acupuntura tem mostrado efeitos benéficos na redução das respostas de estresse nos estudos em animais e em humanos. A fármaco-acupuntura, é uma técnica da acupuntura que consiste na injeção de doses reduzidas de fármacos em pontos de acupuntura, visando o efeito terapêutico sem os efeitos colaterais indesejáveis da dose total do fármaco. Acepromazina (ACP) é um fenotiazínico, comumente utilizado para produzir tranquilização em procedimentos clínicos ou cirúrgicos e no transporte de animais. O presente experimento comparou o efeito da fármaco-acupuntura (VG1- ACP 1/10; injeção de 1/10 da dose usual de acepromazina no ponto de acupuntura VG1), da aqua-acupuntura (VG1-SAL; injeção de salina no ponto de acupuntura VG1), da acepromazina (CTL- ACP; 0,1mg/kg, IM na tábua do pescoço) e da injeção de salina na tábua do pescoço (CTL-SAL) nas respostas de estresse de equinos saudáveis submetidos ao estresse de transporte rodoviário (2,5 horas de duração). Os tratamentos foram realizados imediatamente antes do embarque e foram avaliadas as respostas comportamentais (escore de atividade), temperatura corporal, frequência respiratória, frequência cardíaca (mensurada através de um frequencímetro cardíaco) e o nível de cortisol sérico (mensurado por radioimunoensaio). Foram utilizados 16 equinos machos, sendo transportados 8 animais por viagem, onde cada animal foi transportado duas vezes, com uma semana de intervalo entre as viagens, totalizando 4 viagens e 8 animais por grupo. A posição no caminhão e os tratamentos foram inteiramente casualizados. O transporte rodoviário promoveu aumento na frequência cardíaca (FC Med, FC Max e FC Min), na frequência respiratória, na temperatura corporal e nos níveis de cortisol sérico. A fármaco-acupuntura (VG1-ACP 1/10) foi capaz reduzir o aumento da FC Med induzida pelo estresse, sem alterar outros parâmetros estudados. A aqua-acupuntura (VG1-SAL) não alterou nenhum dos parâmetros estudados. A acepromazina (0,1mg/Kg, IM) produziu sedação considerável e bloqueou o aumento da frequência respiratória induzida pelo estresse, sendo possível sugerir depressão respiratória. Além disso, a acepromazina não preveniu o aumento dos níveis de cortisol induzido pelo estresse. Estes resultados sugerem que o uso da acepromazina no transporte em equinos deve ser considerada com cautela. Outros tipos de estimulação de pontos de acupuntura devem ser testados para verificar o efeito benéfico desta terapia para redução do estresse em equinos.

Palavras-chaves: acepromazina, cavalo, medicina tradicional chinesa

ABSTRACT

GODOI, Tatianne Leme Oliveira Santos. **Influence of pharmaco-acupuncture on stress responses in horses during road transport**. 2011. 43p. Dissertation (Master in Veterinary Medicine Veterinary Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011).

Transport is a potential stressor for horses. Repeated, prolonged or exaggerated reactions to stress are associated with the onset of several diseases. Thus, it is essential to use strategies that can reduce the potential stressor of transport in horses. Acupuncture has shown beneficial effects in reducing stress responses in studies in animals and humans. The pharmaco-acupuncture is a technique of the acupuncture that involves the injection of low doses of drugs to acupuncture points, aiming the therapeutic effect without the unwanted side effects of the total dose of the drug. Acepromazine (ACP) is a phenothiazine, commonly used to produce sedation in clinical or surgical procedures and animal transport. This experiment compared the effect of pharmaco-acupuncture (Group-VG 1- ACP 1 / 10; injection of 1/10 the usual dose of acepromazine at the acupoint VG 1), the aquapuncture (VG 1-SAL, saline injection at the acupoint VG 1), acepromazine (CTL-ACP; 0.1mg/Kg, IM in the neck) and the injection of saline in the neck (CTL-SAL) in the stress responses of healthy horses undergoing the stress of road transport (2,5 hours). The treatments were carried out immediately prior to loading and were evaluated the behavioral responses (activity score) and body temperature, respiratory rate, heart rate (measured using a heart monitor) and serum cortisol level (measured by radioimmunoassay). Sixteen male horses were used, 8 animals being transported per trip, where each animal was transported twice with one week interval between trips, totalizing 4 trips and 8 animals per group. The position on the truck and the treatments were fully randomized. The road transport increased heart rate (HR Med, HR Max and HR Min), respiratory rate, body temperature and serum cortisol levels. The pharmaco-acupuncture (VG 1-ACP 1/10) was able to reduce the stress-induced increase of HR Med, without changing other parameters. The aquapuncture (VG 1-SAL) did not alter any of the parameters studied. Acepromazine (0.1 mg / kg, IM) produced significant sedation and blocked the increase in respiratory rate induced by stress, which may suggest respiratory depression. In addition, acepromazine did not prevent the stress-induced increase of the cortisol levels. These results suggest that the use of acepromazine in horses in transport should be considered with caution. Other types of stimulation of acupuncture points should be tested to verify the beneficial effect of this therapy to reduce stress in horses.

Keywords: acepromazine, horse, medicine tradicional chinese.

LISTA DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

Tabela 1: Relação das respostas de estresse e os distúrbios relativos ao estresse.....	Pag 07
Quadro 1: Quadro ilustrando o desenho experimental utilizado.....	Pag 15
Quadro 2: Escores atribuídos para o grau de atividade.....	Pag 18
Figura 1: Ativação simpato-adrenomedular (SAM) e do eixo do HPA como sistemas primários para a manutenção e restabelecimento da homeostase.....	Pag 05
Figura 2: Esquema geral das vias cerebrais regulatórias de estresse agudo.....	Pag 06
Figura 3: Em A, desenho e em B, figura ilustrando a localização do ponto do Hou Hai - VG1, em inglês GV1.....	Pag 12
Figura 4: Esquema do protocolo experimental.....	Pag 16
Figura 5: Fotografias do embarcadouro e do caminhão de transporte nos momentos de embarque no caminhão (foto do autor).....	Pag 17
Figura 6: Freqüencímetro Polar Equine (modelo Equine RS800cx).....	Pag 18
Figura 7: Programa Polar Pro Trainer Equine Edition®, onde os dados são apresentados dentro de um calendário de exercícios para cada animal. Fonte: Polar Pro Trainer Equine Edition®.....	Pag 19
Figura 8: Quadro do programa Polar Pro Trainer Equine Edition®, onde os dados de frequência cardíaca de cada exercício são apresentados em razão do tempo. Fonte: Polar Pro Trainer Equine Edition®.....	Pag 20
Figura 9: Em A, fotografia do Kit de Radioimunoensaio e B, o contador Gama utilizados no experimento.....	Pag 21
Figura 10(A): Efeito da fármaco-acupuntura na Frequência Cardíaca média de equinos submetidos ao estresse de transporte rodoviário.....	Pag 23
Figura 10(B): Efeito da fármaco-acupuntura na Frequência Cardíaca Média de equinos submetidos ao estresse de transporte rodoviário, considerando apenas o fator tratamento.....	Pag 23
Figura 11: Efeito da fármaco-acupuntura na Frequência Cardíaca máxima (A) e mínima (B) de equinos submetidos ao estresse de transporte rodoviário.....	Pag 24
Figura 12: Efeito da fármaco-acupuntura na temperatura corporal média dos animais submetidos ao estresse.....	Pag 25
Figura 13: Efeito da fármaco-acupuntura na Frequência Respiratória média dos animais submetidos ao estresse.....	Pag 26

Figura 14: Efeito da fármaco-acupuntura na Atividade Comportamental Média dos animais submetidos ao estresse.....Pag 27

Figura 15: Efeito das viagens na concentração de Cortisol Sérico dos animais submetidos ao estresse.....Pag 28

Figura 16: Efeito da fármaco-acupuntura na concentração de Cortisol Sérico dos animais submetidos ao estresse..... Pag 29

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

Abreviação

ACP: Acepromazina
ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico
ANOVA: Análise de Variância
ARC: Núcleo Arqueado do Hipotálamo
AVP: Vasopressina
B1: Coleta de sangue 1
B2: Coleta de sangue 2
B3: Coleta se sangue 3
BP6: Ponto de acupuntura 6 do Baço-Pâncreas
C3: Ponto de acupuntura 3 do Coração
CRH: Corticotropina
CRH: Hormônio Liberador de Corticotropina
CTL-ACP 1%: Controle Acepromazina 1%
CTL-SAL: Controle Salina
DE: Desembarque
E: Embarque
E36: Ponto de acupuntura 36 do Estomago
FC Max: Frequência Cardíaca Máxima
FC Med: Frequência Cardíaca Média
FC Min: Frequência Cardíaca Mínima
FC: Frequência Cardíaca
FR Final: Frequência Respiratória Final
FR Inicial: Frequência Respiratória Inicial
FR: Frequência Respiratória
GR: Receptor Glicocorticóide
HPA: Hipotálamo-Pituitária-Adrenal
L2: Vértebra lombar 2
MR: Receptor de Mineralocorticóide
MRM: Movimentos Respiratórios por Minuto
MTC: Medicina Tradicional Chinesa

OCV: Órgão Circunventriculares
PAGvl: Susbstância Cinzenta Periaqueductal Ventrolateral
PC6: Ponto de acupuntura 6 do Pericárdio
PVN: Paraventricular do Hipotálamo
Qi: Termo chinês referente a energia vital
RIE: Radioimunoensaio
S1: Coletas de saliva 1
S2: Coletas de saliva 2
S3: Coletas de saliva 3
S4: Coletas de saliva 4
S5: Coletas de saliva 5
S6: Coletas de saliva 6
SAM: Sistema Simpato-Adrenomedular
SNA: Sistema Nervoso Autônomo
T1: Vértebra torácica 1
TA7: Ponto de acupuntura 7 do Triplo Aquecedor
Temp: Temperatura em graus Celsius
TENS: Estimulação Elétrica Transcutânea
TI: Início do transporte
UFRRJ/ COMEP: Comitê de Ética na Pesquisa da UFRRJ
UFRRJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
VC17: Ponto de acupuntura 17 do Vaso Comando
VFC: Variabilidade da Frequência Cardíaca
VG1: Ponto de acupuntura Vaso Governador 1
VG1-ACP 1/10: Acepromazina 1/10 da dose no ponto de acupuntura VG1
VG1-SAL: Solução salina no ponto de acupuntura VG1
VG20: Ponto de acupuntura 20 do Vaso Governador
VLMr: Bulbo Rostral Ventrolateral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Justificativa	2
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Geral	3
1.2.2 Específicos.....	3
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Neurobiologia do Estresse	4
2.1.1 Marcadores de Estresse	7
2.2 Transporte como fator de estresse para equinos	8
2.3 Acupuntura e Medicina Tradicional Chinesa	9
2.3.1 Pesquisa científica em Acupuntura.....	10
2.3.1 Características do ponto segundo a Medicina Tradicional Chinesa.....	11
2.4 Acepromazina	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Animais	14
3.2 Tratamentos	14
3.3 Desenho experimental	14
3.4 Adaptação aos procedimentos de coleta de dados	15
3.5 Protocolo experimental	16
3.6 Coletas de sangue e saliva	17
3.7 Transporte rodoviário	17
3.8 Avaliação comportamental	17
3.9 Mensuração da temperatura corporal e frequência respiratória	18
3.10 Uso dos frequencímetros	18
3.11 Análise da Frequência cardíaca	19
3.12 Análise do cortisol	20
3.13 Estatística	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Análise da Frequência Cardíaca durante o estresse de transporte	22
4.2 Análise da Temperatura Corporal	25
4.3 Análise da Frequência Respiratória	25
4.4 Análise da Atividade Comportamental	26

4.5 Análise do cortisol sérico e salivar	27
4.5.1 Análise do cortisol sérico	27
4.5.2 Análise do cortisol salivar	29
5. DISCUSSÃO	30
5.1 Frequência Cardíaca durante o estresse de transporte	30
5.2 Temperatura Corporal e Frequência Respiratória	32
5.3 Análise do Comportamento	32
5.4 Níveis de cortisol durante o estresse	33
6. CONCLUSÕES.....	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
8. ANEXOS	43
8.1. Ficha de avaliação individual dos animais durante o transporte.....	43

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de transporte de equinos para fins de competição, criação, lazer, venda e abate tem aumentado significativamente ao longo dos anos. Entretanto, durante o transporte os animais podem ser submetidos a uma ampla gama de fatores estressantes que frequentemente estão associados ao aparecimento de doenças. Desta forma, fazem-se relevantes estratégias para minimizar o estresse, almejando a conservação do bem estar e saúde dos mesmos.

A administração de fármacos a fim de reduzir o estresse deles no transporte, tem sido amplamente utilizada, porém essa prática pode gerar no animal efeitos colaterais não satisfatórios.

A acupuntura é uma das terapias da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) utilizada no tratamento e prevenções de doenças, que visa à harmonia da energia vital (Qi) através da manutenção do estado de equilíbrio do corpo. Um dos muitos usos clínicos da acupuntura é o tratamento dos efeitos deletérios do estresse. Uma das técnicas de estimulação de pontos de acupuntura é a fármaco-acupuntura, que consiste na aplicação de fármacos em pontos de acupuntura. É um método muito utilizado em grandes animais, pois requer um curto período de contenção, utiliza materiais de fácil acesso como a agulha hipodérmica e doses reduzidas de fármacos. Esta técnica objetiva a obtenção dos resultados terapêuticos esperados, sem os efeitos colaterais indesejáveis da dose total do fármaco.

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

No presente experimento avaliaremos a atuação da fármaco-acupuntura (1/10 da dose de Acepromazina) no ponto VG1 sobre o estresse induzido pelo transporte rodoviário em equinos através da análise de parâmetros comportamentais, fisiológicos (frequência cardíaca, temperatura, frequência respiratória) e endócrinos (níveis séricos de cortisol).

1.1 Justificativa

Frente à necessidade de redução do estresse durante o transporte de equinos e ao fato de que os fármacos utilizados para esse fim podem gerar efeitos indesejáveis, justifica-se a execução de um estudo empregando a fármaco-acupuntura prévia ao transporte de equinos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Geral

Estudar o efeito da fármaco-acupuntura nas respostas de estresse de equinos saudáveis submetidos ao estresse de transporte rodoviário.

1.2.2 Específicos

- Estudar o efeito da estimulação do ponto de acupuntura VG1 com acepromazina $0,01\text{mg Kg}^{-1}$ (1/10 da dose usual) nas respostas comportamentais de equinos saudáveis submetidos ao estresse de transporte rodoviário.
- Estudar o efeito da estimulação do ponto de acupuntura VG1 com acepromazina $0,01\text{mg Kg}^{-1}$ (1/10 da dose usual) nas respostas endócrinas (cortisol sérico e salivar) de equinos saudáveis submetidos ao estresse de transporte rodoviário.
- Estudar o efeito da estimulação do ponto de acupuntura VG1 com acepromazina $0,01\text{mg Kg}^{-1}$ (1/10 da dose usual) nos parâmetros fisiológicos como frequência cardíaca, temperatura corporal e frequência respiratória de equinos saudáveis submetidos ao estresse de transporte rodoviário.

2. REVISÃO DE LITERATURA

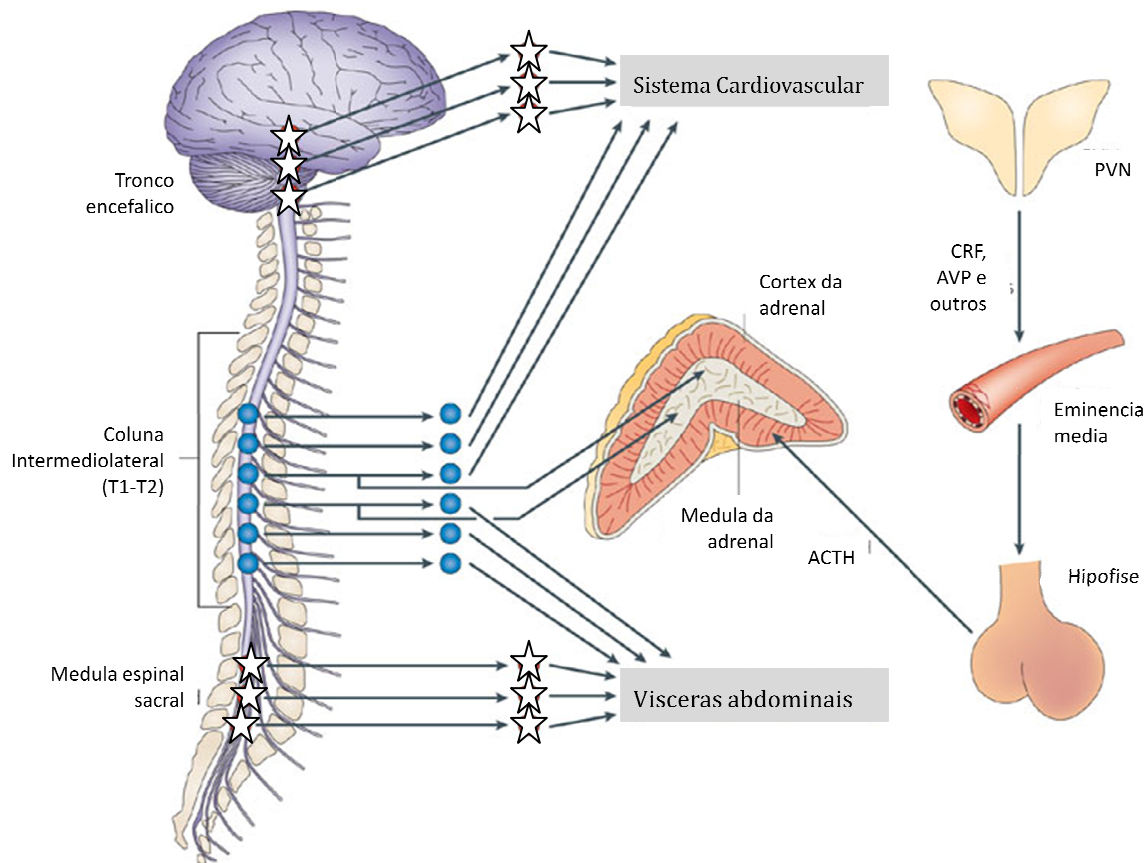
2.1 Neurobiologia do Estresse

Estresse, segundo Seyle (1936), seria a situação gerada por um desafio ao qual um organismo estaria submetido. Sendo assim estresse é o termo referente à condição provocada por um desafio, e o neologismo estressor designa o agente causador do estímulo. Em certo sentido, o estresse pode ser definido como qualquer ameaça à homeostase. Para atingir ou manter a homeostase, reações adaptativas são desenvolvidas pelo organismo. Tais reações podem ser específicas para um determinado agente ou genéricas e inespecíficas, mais em função da intensidade do estressor e não a sua natureza (CHROUSOS; LORIAUX; GOLD, 1988). A resposta a um estímulo estressor é fundamental para homeostase de um ser vivo e sua sobrevivência. Nas condições de estresse (homeostase desafiada), o organismo reage por meio da ativação e desativação de mecanismo de controle de várias funções para recuperar e manter a homeostase. As respostas adaptativas podem ser insuficientes para restabelecer ou manter a homeostase (FRANCI, 2005) e a resposta inadequada a um estímulo estressor pode representar risco de doenças.

A informação relacionada ao estressor proveniente de sistemas sensoriais principais: como pistas interoceptivas, como a volemia e a osmolaridade e/ou pistas exteroceptivas, como o cheiro do predador é enviado ao cérebro, que recruta sistemas neurais e neuroendócrinos (efetores) para minimizar o evento estressor para o animal. As respostas fisiológicas ao estresse envolvem uma associação de sistemas altamente eficientes e integrados e objetiva à manutenção da integridade fisiológica, mesmo nas circunstâncias de demanda (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Em uma situação de estresse, dois eixos neuroendócrinos são ativados: o sistema simpato-adrenomedular (SAM), que promove aumento da secreção de catecolaminas e consequentemente excitação rápida do sistema cardiovascular, levando a um aumento da frequência cardíaca e da pressão arterial; e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), que leva a um aumento na produção de cortisol, e consequente mobilização de energia (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009) (ver figura 1).

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



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 1: Ativação simpato-adrenomedular (SAM) e do eixo do HPA 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 espinhal toracolombar (T1 a L2). Estes neurônios pré-ganglionares se projetam para gânglios pré e para vertebrais que então terminam em órgãos alvo e nas células cromafins da medula da adrenal. Esta ativação simpática (em círculos) representa a resposta clássica de luta e fuga, que foi primariamente caracterizada por Walter Cannon e colaboradores no início do século passado e leva a um aumento dos níveis de adrenalina (proveniente da adrenal) e de noradrenalina dos terminais simpáticos, aumento da frequência e da força de contração do coração, vasoconstrição periférica e mobilização de energia. O tônus parassimpático também é mobilizado durante o estresse. No sistema parassimpático (em estrelas), representa a ativação de núcleos pré-ganglionares crânio-sacrais ativam núcleos pós-ganglionares localizados próximos aos órgãos inervados, com efeito geralmente oposto ao sistema simpático. Para o eixo HPA, a exposição ao estressor ativa neurônios hipofisiotróficos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) que secretam hormônios de liberação, como hormônio liberador de corticotropina (CRH) e vasopressina (AVP) na circulação porta da eminência média. Estes hormônios liberadores atuam na hipófise anterior para promover a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) que atua no córtex da adrenal (zona fasciculata) para iniciar a síntese e liberação dos hormônios glicocorticóides (cortisol em cavalos). Os glicocorticóides circulantes promovem a mobilização de energia estocada e potencializam numerosos efeitos simpáticos, como a vasoconstrição periférica. Além disso, o córtex da adrenal é diretamente inervado pelo sistema simpático, que regula a liberação de cortisol. Então a ativação do sistema simpático e do eixo HPA tem ações complementares no organismo, incluindo a mobilização de energia e a manutenção da pressão arterial durante o estresse (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

Diversas estruturas cerebrais estão envolvidas nas respostas de estresse. A figura 2 apresenta um esquema geral das vias neurais que regulam as respostas de estresse. Estruturas límbicas prosencefálicas, hipotálamo e o tronco encefálico recebem aferências de outras regiões e promovem a excitação ou inibição do eixo HPA e do SNA. Algumas estruturas límbicas como o hipocampo e o córtex pré-frontal possuem atividade modulatória sobre o eixo HPA, enquanto que diferentes núcleos da amígdala excitam tanto o eixo HPA como o

SNA. Desta forma a integração da atividade destas estruturas cerebrais é responsável pela modulação da magnitude da resposta de estresse. Além disso, vale ressaltar que a ativação de diferentes estruturas límbicas é responsável pela sensação de ansiedade durante uma experiência de estresse. A hiperativação da amígdala ou a hipoativação de neurônios hipocámpais pode resultar em uma resposta de estresse exacerbada (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

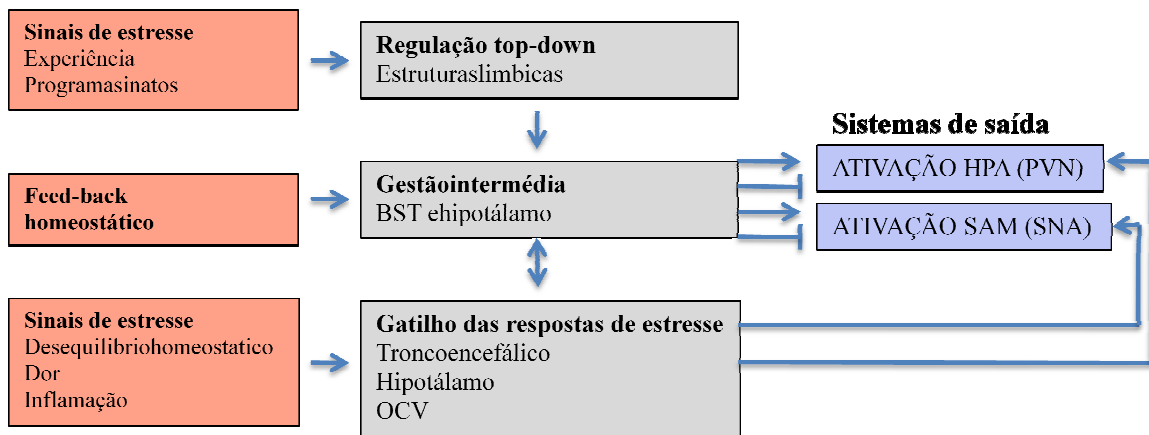


Figura 2: Esquema geral das vias cerebrais regulatórias de estresse agudo. Estressores ativam o tronco cerebral e/ou estruturas límbicas do prosencéfalo. O tronco cerebral pode gerar respostas rápidas do eixo HPA e do sistema nervoso autônomo (SNA) através de projeções diretas para os neurônios hipofisiotróficos no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) ou para neurônios pré-ganglionares autônomos. Por outro lado, regiões límbicas do prosencéfalo (regulação “top-down”) não têm ligações diretas com o eixo HPA ou o SNA e, portanto, necessitam de outros neurônios antes que possam acessar os neurônios autonômicos ou neuroendócrinos. Uma alta proporção desses neurônios intermediários está localizada em núcleos hipotalâmicos que também respondem ao status homeostáticos, proporcionando um mecanismo pelo qual a informação descendente límbica pode ser modulada de acordo com o estado fisiológico do animal (“gestão intermediária”). BST, núcleo leito da estria terminal; OCV, órgão circunventriculares; SAM, sistema simpato-adrenomedular (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

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

O cortisol tem 10 vezes mais afinidade ao MR que ao GR. Em níveis baixos de cortisol ou situações de ausência de estresse, a maior parte do cortisol liga-se aos MRs no cérebro (principalmente no hipocampo) e modula a atividade basal do eixo HPA e o aparecimento de resposta ao estresse. Como os níveis de cortisol mais altos, o GR se torna cada vez mais ligado, reduzindo a atividade do eixo HPA (mecanismo de “feed-back” negativo). No entanto a ativação crônica deste receptor está ligada a vários distúrbios cognitivos relativos ao estresse (DE KLOET; OITZL; JOËLS, 1999).

Apesar das respostas de estresse serem fundamentais para a sobrevivência das espécies, a ativação constante das respostas de estresse pode produzir efeitos deletérios. Esta hiperativação pode ocorrer pela exposição repetida a situações de estresse ou a uma sensibilidade exagerada do indivíduo a situações corriqueiras, levando a uma resposta de estresse prolongada e aumentada. O prolongamento temporal da exposição ao estresse

("estresse crônico") provoca aumento considerável do tônus basal do eixo HPA, assim como aumento da reatividade ao estresse. Estas mudanças ocorrem apesar da secreção basal de glicocorticóides ser alta e cumulativa, sugerindo que existem mecanismos para contornar a inibição do "feedback" negativo, eixo HPA (AKANA et al., 1992). O resultado final é a hipersecreção basal de glicocorticóides, hipertrofia adrenal e / ou atrofia do timo (ULRICH-LAI et al., 2006), um aumento na tônus central do eixo HPA, baixa regulação dos receptores de glicocorticóides (GR) em regiões-chave de "feedback" do eixo HPA (HERMAN et al., 1995), facilitação de respostas de corticosteróide a estressores novos (AKANA et al., 1992), redução da eficácia do "feedback" negativo dos glicocorticóides (MIZOGUCHI et al., 2003); depressão e alterações comportamentais (WILLNER et al., 2005). Todas estas seqüelas podem ser associadas a mudanças nas vias centrais responsáveis pela regulação do eixo HPA, incluindo com destaque as vias que medeiam as respostas antecipatórias ao estresse, como a amígdala (hipertrofia dentrítica) e o hipocampo (atrofia dentrítica e redução da sensibilidade ao GR) (JANKORD; HERMAN, 2008).

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

Tabela 1: Relação das respostas de estresse e os distúrbios relativos ao estresse

Respostas ao Estresse	Desordens relativas ao Estresse
Mobilização de energia	Miopatia, fadiga, diabetes
Aumento do tônus cardiovascular	Hipertensão induzida por estresse
Supressão da digestão	Úlcera gástrica
Supressão do crescimento	Darwinismo psicogênico
Supressão da reprodução	Amenorréia, impotência, diminuição da libido
Supressão do sistema imune	Incremento de risco de doenças
Modelagem da cognição	Morte celular

(SAPOLSKY, 1992)

2.1.1 Marcadores de Estresse

A mensuração dos níveis de estresse pode ser realizada através de parâmetros fisiológicos e comportamentais. Em equinos, as respostas de estresse são bem descritas e incluem, além da elevação do cortisol plasmático e salivar, elevadas frequências respiratórias e cardíacas (e da variabilidade da frequência cardíaca), aumento da temperatura corporal e da pressão arterial e de expressão facial típica entre muitos outros sinais comportamentais específicos (DOBROMYLSKYJ et al., 2000; SCHATZMANN, 2000; RIETMANN et al., 2004). Os níveis de cortisol estão relacionados positivamente com a frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR) e com a temperatura retal. Os valores das correlações dos níveis de cortisol com as características fisiológicas demonstram uma estreita relação entre estas variáveis, o que caracteriza uma reação do organismo animal à presença de possíveis agentes estressores (TEIXEIRA; PADUA, 2002).

2.2 Transporte como fator de estresse para equinos

O transporte é um potencial fator estressante para as várias espécies de animais domésticos e em cativeiro. O cavalo tem sido transportado ao longo de séculos, sendo o primeiro meio de transporte o navio e depois o trem. Com o aumento dos esportes eqüestres, recentemente elevou-se rapidamente o número de animais transportados por estradas e por via aérea (CREGIER, 1982; FRIEND, 2001).

Durante o transporte, cavalos podem ser submetidos a uma ampla gama de estressores em potencial, incluindo o isolamento dos companheiros de rebanho, proximidade forçada com cavalos estranhos ou agressivos, ou com ambiente ameaçador, exposição a novos patógenos, privação de atividades padrões normais, adoção forçada de uma postura anormal, temperaturas extremas, privação de água e comida, temperatura e alimentação, e submissão a poeira e partículas suspensas no ar. Há muito se sabe que o transporte pode estar associado à morbidade em cavalos. O termo "febre do transporte" foi originalmente utilizado para a pneumonia que normalmente ocorria em cavalos transportados durante a I Guerra Mundial (KING, 1992). No entanto, com o treinamento e experiência adequados, muitos cavalos facilmente se adaptam ao transporte em uma ampla gama de veículos (FRIEND, 2001).

O transporte, geralmente, é um fator de estresse em cavalos que pode, por exemplo, levar à reativação da salmonelose (OWEN; FULLERTON; BARNUM, 1983), elevar a frequência cardíaca (CLARK; FRIEND; DELLMEIER, 1993; SMITH et al., 1994; WARAN; CUDDEFORD, 1995) e causar aumento do cortisol (CLARK; FRIEND; DELLMEIER, 1993; FRIEND et al., 1998; FRIEND, 2000; STULL; RODIEK, 2000) que são alterações indicativas de estresse agudo. Cavalos apresentam desidratação acentuada após 24h e desidratação extrema após 28h de transporte em condições quentes e úmidas, quando há pouco resfriamento noturno. Dar água aos cavalos a bordo de trailers alivia a desidratação, mas a fadiga pode tornar-se extrema após 28 h de transporte (FRIEND et al, 1998; FRIEND, 2000; STULL; RODIEK, 2000). Transportes de pequena duração não tem sido relacionado a um aumento na incidência de morte embrionária (BAUCUS et al., 1990a), nem a alterações de comportamento durante o estro, na ovulação, no ciclo estral, ou nos picos de estradiol ou LH (BAUCUS et al., 1990b). No entanto MCGee (1969), não recomenda o transporte de longa distância de éguas em final da gestação porque o transporte pode levar à ruptura da artéria uterina e a posterior morte da égua. Na interpretação destes estudos, é importante perceber que a maioria dos pesquisadores tem utilizado relativamente cavalos mansos que têm experiência em ser transportados ou aceitam facilmente ser transportado (FRIEND, 2001).

Ao comparar as alterações de algumas enzimas plasmáticas e de parâmetros bioquímicos do sangue, Codazza; Maffeo; Redaelli (1974) constataram que, em geral, o transporte (300 km) tem um efeito diferente do exercício sobre a função muscular. No entanto, eles concluíram que cavalos ainda devem ser transportados pelo menos 48 h antes uma corrida para permitir que os valores bioquímicos retornem ao normal. Quando os cavalos foram transportados apenas 90 km, o transporte não teve efeito significativo sobre as concentrações séricas de sódio, potássio, cloreto, glicose, ou total proteína ou no submáximo exercício seguinte (BEAUNOYER; CHAPMAN, 1987).

O transporte também pode resultar em danos físicos para cavalos. Isso pode ocorrer através de colisões envolvendo o transporte de veículos, paradas súbitas, fadiga, perda de equilíbrio, ou ataques de cavalos agressivos. Somado a estes fatores, o uso da força no embarque e o desembarque do caminhão de transporte são fatores adicionais de estresse para o cavalo. O uso da força ou a indução de dor aumentam muito a probabilidade de lesão no cavalo e no manipulador e, invariavelmente, são situações estressantes para o cavalo e frustrante para o manipulador. Além do risco de dano físico, esse estresse e a frustração

também podem ser prejudiciais para a relação entre cavalo e manipulador e ter um impacto negativo sobre a formação do animal (SHANAHAN, 2003). Baseado no aumento das concentrações de cortisol plasmático foi repetidamente demonstrado que o transporte é estressante para os cavalos (BAUCUS et al., 1990a; BAUCUS et al., 1990b; CLARK; FRIEND; DELLMEIER, 1993; SMITH et al., 1996; FRIEND, 2000; STULL; RODIEK, 2000; FAZIO; FERLAZZO, 2003; FAZIO et al., 2008). Schmidt e colaboradores (2010) usaram técnicas não-invasivas, tais como a análise do cortisol salivar e análise de metabólitos de cortisol nas fezes a fim de evitar reações de estresse dos animais por punção venosa repetida. A análise do cortisol na saliva e no plasma de cavalos reflete alterações agudas na liberação de cortisol (SCHMIDT et al. 2009). Enquanto que a análise de metabólitos do cortisol das fezes, devido ao tempo de passagem intestinal (PALME et al., 1996) aumenta somente 4h após um aumento no sangue e refletem principalmente situações estressantes prolongadas (PALME e MÖSTL, 1997; MERL et al., 2000). O transporte de cavalos também provoca mudanças na frequência cardíaca (CLARK; FRIEND; DELLMEIER, 1993; WARAN, 1993; SMITH et al., 1994; WARAN; CUDDERFORD, 1995; WARAN, 1996) e variabilidade da frequência cardíaca (VFC) (OHMURA; HIRAGA; AIDA, 2006). Variabilidade da frequência cardíaca, ou seja, as flutuações de curto prazo do ritmo cardíaco são 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). Por isso, a variabilidade da frequência cardíaca é utilizada como um indicador para a resposta do sistema nervoso autônomo ao estresse (SCHMIDT et al., 2010).

Com base no potencial efeito estressor do transporte para equinos, deve-se buscar estratégias para minimizar o estresse de animais transportados. No Brasil, a lei de Bem-estar animal, Instrução Normativa nº 56 de 2008, preconiza o manejo cuidadoso e responsável nas várias etapas da vida do animal, desde o nascimento, criação e transporte, sendo de extrema importância o manejo e o transporte de forma adequada, objetivando reduzir o estresse e evitar contusões e sofrimento desnecessário (BRASIL, 2008).

2.3 Acupuntura e Medicina Tradicional Chinesa

A acupuntura é derivada dos radicais latinos “acus e pungere”, que significam agulha e puncionar respectivamente. Este procedimento visa à terapia e cura das enfermidades pela aplicação de estímulos através da pele, com a inserção de agulhas em pontos específicos (WEN, 1989; JAGGAR, 1992; SCHOEN, 2001) chamados acupontos.

Segundo hipótese de Mann (1992), 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.

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 (GUIMARÃES et al., 1997).

A acupuntura equina tem desempenhado um papel importante na civilização chinesa

desde os tempos antigos. 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).

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

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

2.3.1 Pesquisa científica em Acupuntura

Muitos estudos demonstraram os efeitos da acupuntura no estresse. Liao (1978) demonstrou que a estimulação elétrica do ponto E36 (conhecido também por Zusanli) inibiu a hipersecreção de corticosterona induzida pelo estresse de imobilização em coelhos. Em indivíduos saudáveis, a acupuntura nos mesmos pontos, significativamente reduz as elevações na pressão arterial induzida pelo estresse (MIDDLEKAUFF; YU; HUI, 2001). Em ratos, a eletroacupuntura nos pontos PC6 e C3 reduziu os níveis de adrenalina e noradrenalina, a frequência cardíaca e a pressão arterial de animais submetidos ao estresse de imobilização (YANG et al., 2002).

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

Além destes efeitos moduladores das respostas de estresse, estudos recentes têm comprovado a indicação milenar do uso da acupuntura para o tratamento de alterações cognitivas. A estimulação elétrica transcutânea (TENS) é capaz de melhorar a memória de curta e longa duração, a fluência verbal, as funções físicas e afetivas de pacientes com Doença de Alzheimer (GUO et al., 2002). Em ratos, a acupuntura atenua os déficits na resposta da esQUIVA passiva causados pela ciclohexamida, mas não tem efeito nas alterações causadas pela escopolamina (CHANG et al., 1999). Estes efeitos da acupuntura nas funções cognitivas podem estar relacionados a alterações plásticas do SNC. A estimulação do ponto Zusanli (E36) é capaz de aumentar a proliferação celular no giro denteado (KIM et al., 2003), diminuir a expressão de c-Fos e a apoptose no CA1 (JANG et al., 2003) de gerbils após isquemia causada por oclusão das carótidas. Além disso, a acupuntura também se mostrou efetiva nas alterações plásticas induzidas por estresse. A estimulação do ponto 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).

No presente experimento como forma de redução do estresse será usada associação da acupuntura com fármaco acepromazina. Esta técnica de introduzir um fármaco num ponto de acupuntura é conhecida como fármaco-acupuntura. É um método da acupuntura muito utilizado em grandes animais, pois requer um curto período de contenção e utiliza materiais de fácil acesso como a agulha hipodérmica, e as doses dos fármacos administrados são reduzidas, e mesmo assim apresentam o resultado esperado sem os efeitos colaterais indesejáveis. Se no ponto de acupuntura for introduzido água destilada ou soro fisiológico esta técnica denomina-se aqua-acupuntura. O objetivo dessa técnicas é fornecer um estímulo mecânico prolongado no acuponto (LUNA et al, 2008).

Outras substâncias também podem ser utilizados para esse fim como glicose e vitaminas. Sangue autólogo (hemopuntura) e veneno de abelha (apipuntura) são injetados principalmente para efeitos antiinflamatórios (BAEK et al., 2006; LEE et al., 2005). Recentemente, fármaco-acupuntura, ou seja, injeção de doses subclínicas de drogas em pontos de acupuntura, tem sido aprovada com resultados bem sucedidos. Autores chineses afirmam que esta técnica aumenta o período de estímulo mecânico e produz efeitos semelhantes aos de doses convencionais (ZHANG; WU; JIANG, 2005 ;JIN; XU; ZHENG, 2006).

O acuponto Hou Hai, também chamado Chang Qiang (Vaso Governador 1-VG1), tem indicação sedativa. No entanto, VG1 é um acuponto de sedação pouco utilizado em seres humanos devido à sua localização, no ponto médio da linha que liga o fim do cóccix e o ânus, abaixo da ponta do cóccix. Por outro lado, em cavalos, VG 1, situada entre o ânus e a cauda, é um ponto de fácil acesso (LUNA et al, 2008).

2.3.1 Características do ponto segundo a Medicina Tradicional Chinesa

Localizado numa depressão entre o ânus e a base ventral da cauda.

Natureza do VG1: ponto de conexão do Vaso Governador

Indicações:

- Regulariza os Vasos Governador e Diretor
- Resolve a umidade-calor
- Acalma a mente

Este é o ponto de início e de Conexão do Vaso Governador. Sendo o ponto de conexão, conecta-se com o vaso Diretor. Sendo a terminação mais inferior do Vaso Governador, VG-1 pode ser utilizado para acalmar a mente nas patologias mentais caracterizadas por agitação (MACIOCIA, 1996). Figura 3.

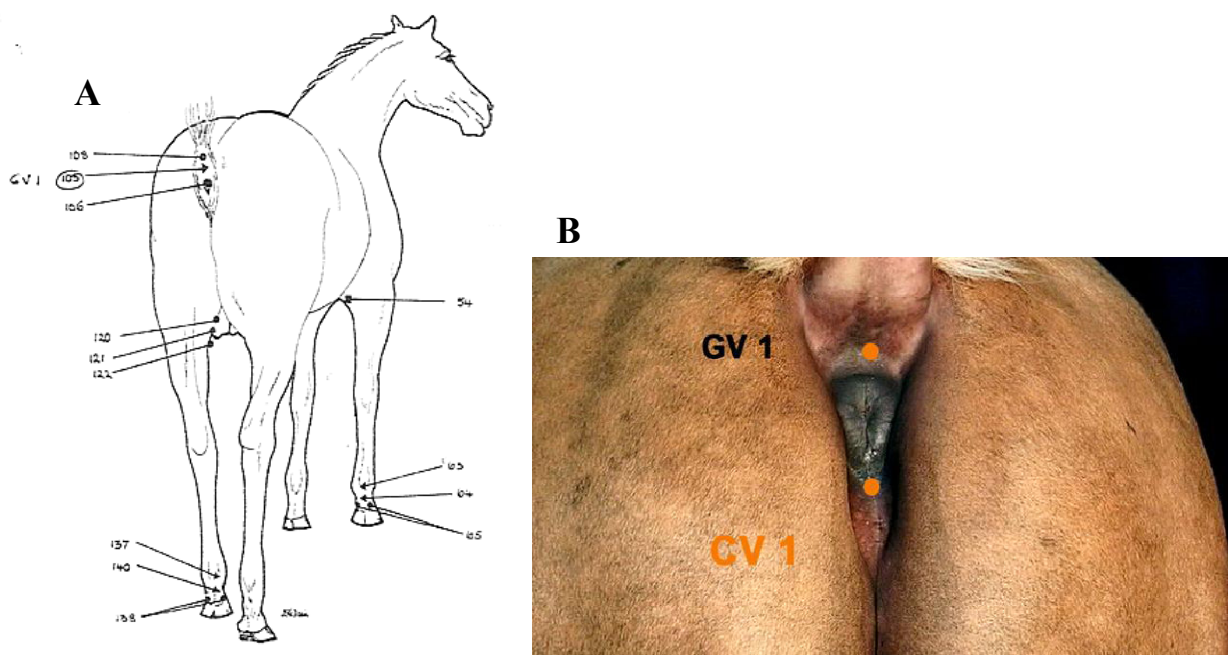


Figura 3: Em A, desenho e em B figura ilustrando a localização do ponto do Hou Hai - VG1, em inglês GV1. (HOLISTICVETPETCARE, 2011) Em B: Atlas de pontos de acupuntura no cavalo (IVAS)

2.4 Acepromazina

Acepromazina (ACP) é um derivado fenotiazínico comumente administrado nos animais domésticos, usado regularmente para reduzir o estresse durante o transporte e em de procedimentos clínicos ou cirúrgicos. A ACP é utilizada como medicação pré-anestésica na Medicina Veterinária e como tranquilizante para realização de exames, tratamentos, embarques e transporte. Esses agentes são classificados como antipsicóticos ou neurolépticos e promovem tranquilização leve, sem que ocorra desligamento do animal ao meio ambiente. Ao contrário dos fármacos sedativos, incremento da dose não aumenta o grau de tranquilização apenas os efeitos adversos (ADAMS, 2003).

Acepromazina tem ações em todos os níveis do sistema nervoso central, principalmente a nível subcortical, bem como em sistemas de múltiplos órgãos. Acepromazina tem forte atividade anti-adrenérgica e uma fraca atividade anticolinérgica periférica, além de produzir um relativamente leve bloqueio ganglionar. Possui também ligeira atividade anti-histamínica e anti-serotonina. Os mecanismos de ação da droga incluem:

- a ação como antagonista de receptores dopaminérgicos pos-sinápticos resultando em propriedades antipsicóticas em sintomas produtivos e improdutivos; (KANBA et al., 1994; SEEMAN, 2002).

- ação como antagonista de receptores serotoninérgicos (5-HT1 e 5-HT2) que resulta em efeito antidepressivo, ansiolítico e anti-agressivo, bem como uma atenuação dos efeitos colaterais extrapiramidais produzidos pela ação em receptores dopaminérgicos. O efeito como antagonista serotoninérgico também pode levar ao ganho de peso, queda da pressão arterial, sedação e dificuldades ejaculação;

- ação em receptores histaminérgicos pode produzir sedação antiemese, vertigem, queda da pressão arterial e ganho de peso (receptores H1); (COSI, C.; KOEK, W., 2001).

- ação como antagonista α_1 e α_2 , com propriedades simpátolíticas, levando a redução da pressão arterial, taquicardia reflexa, vertigem, sedação, hipersalivação e incontinência;

(CAHIR; KING, 2005)

-ação anticolinérgico (receptores M1/M2) promovendo boca seca, visão turva, obstipação, dificuldade / incapacidade de urinar, taquicardia sinusal, alterações ECG-e perda de memória, mas a ação anticolinérgica pode também atenuar efeitos colaterais extrapiramidais. (CAHIR; KING, 2005)

Em cavalos, os efeitos colaterais são: ptose palpebral, ligeira protusão da membrana nictante, prolapso peniano, abaixamento de cabeça e depressão cardiorrespiratória, levando à hipotensão. Essa redução de pressão é dose dependente, podendo acarretar taquicardia reflexa e aumento da concentração de catecolaminas circulantes. Pode-se verificar, também, diminuição da pressão venosa central, que está relacionado diretamente com o aumento da frequência cardíaca, combinada com a redução da resistência vascular sistêmica, resultando no aumento inicial do débito cardíaco. Outros efeitos encontrados são depressão miocárdica, diminuição da temperatura corporal, aumento da perfusão cutânea e visceral, ação antiarritmica, diminuição da concentração de hemoglobina e vasodilatação esplênica. Nos animais com estado de alerta normal, a tranquilização é sempre útil, uma vez que diminui o estresse e o medo, facilitando o seu manuseio (FANTONI E CORTOPASSI, 2002).

Baseado no uso corrente e nas indicações da ACP para o transporte de equinos (ADAMS, 2003), neste estudo foi utilizada este fármaco como controle positivo para produzir sedação e potencialmente reduzir as respostas de estresse induzidas pelo estresse de transporte.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os animais utilizados no presente estudo são provenientes do plantel da equinocultura da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Foram utilizados 16 equinos, garanhões, com idade entre 24 a 60 meses, pesando entre 250 - 450 kg, em condições saudáveis, sem sintomas de doenças, vacinados e com exame de Anemia Infecciosa Equina negativo. Quinze animais da raça Mangalarga Marchador e um mestiço Bretão Postier com Mangalarga Marchador.

Todos os cavalos nasceram no criatório da Universidade e convivem desde a desmama num pasto separado, com manejo de pastejo contínuo.

Todos os procedimentos estão de acordo com a lei de bem-estar animal, Instrução Normativa nº 56 de 2008, sendo o presente experimento aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da UFRRJ/ COMEP no. 23083.003626/2011-61.

3.2 Tratamentos

Os animais foram divididos em quatro grupos de tratamentos diferentes como exemplificado abaixo:

1 GRUPO CONTROLE NEGATIVO (CTL-SAL): 0,01 ml kg⁻¹ de solução salina administrado por via intramuscular na tábua do pescoço.

2 GRUPO CONTROLE POSITIVO (CTL-ACP): 0,1 mg kg⁻¹ de Acepromazina 1% administrado por via intramuscular na tábua do pescoço.

3 GRUPO AQUA-ACUPUNTURA (VG1-SAL): 0,01 ml kg⁻¹ de solução salina administrado no ponto de Acupuntura VG1.

4 GRUPO FÁRMACO-ACUPUNTURA (VG1-ACP 1/10): 0,01 mg kg⁻¹ de Acepromazina 1% (1/10 da dose recomendada) administrado no ponto de Acupuntura VG1.

Em todos os grupos o volume total administrado foi de 1 ml por 100kg, sendo utilizada solução salina para completar os volumes calculados para dose de acepromazina de 0,1 mg kg⁻¹. Todos os tratamentos foram realizados imediatamente antes do embarque.

3.3 Desenho experimental

O desenho experimental foi delineamento inteiramente casualizado. Onde foram realizadas 4 viagens com 8 animais cada, sendo estes divididos em quatro grupos de tratamentos (perfazendo 2 animais por grupo/viagem e 8 animais por grupo). Cada um dos 16 animais foi transportado duas vezes com uma semana de intervalo entre as viagens, sendo que cada animal foi submetido a diferentes tratamentos e diferentes posições dentro do caminhão, conforme o quadro abaixo. Quadro 1

Quadro 1: Quadro ilustrando o desenho experimental utilizado.

Viagem 1 (Primeira vez)		Viagem 3 (segunda vez)	
Posição no caminhão/Animal	Tratamento	Posição no caminhão/Animal	Tratamento
1°. A1	1. CTL-SAL	1°. A6	2. CTL-ACP
2°. A2	3. VG1-SAL	2°. A5	4. VG1-ACP/10
3°. A3	4. VG1-ACP/10	3°. A8	1. CTL-SAL
4°. A4	2. CTL-ACP	4°. A7	3. VG1-SAL
5°. A5	3. VG1-SAL	5°. A2	2. CTL-ACP
6°. A6	1. CTL-SAL	6°. A1	4. VG1-ACP/10
7°. A7	2. CTL-ACP	7°. A4	1. CTL-SAL
8°. A8	4. VG1-ACP/10	8°. A3	3. VG1-SAL
Viagem 2 (Primeira vez)		Viagem 4 (segunda vez)	
Posição no caminhão/Animal	Tratamento	Posição no caminhão/Animal	Tratamento
1°. B1	4. VG1-ACP/10	1°. B6	3. VG1-SAL
2°. B2	2. CTL-ACP	2°. B5	1. CTL-SAL
3°. B3	3. VG1-SAL	3°. B8	2. CTL-ACP
4°. B4	1. CTL-SAL	4°. B7	4. VG1-ACP/10
5°. B5	4. VG1-ACP/10	5°. B2	1. CTL-SAL
6°. B6	2. CTL-ACP	6°. B1	3. VG1-SAL
7°. B7	3. VG1-SAL	7°. B4	4. VG1-ACP/10
8°. B8	1. CTL-SAL	8°. B3	2. CTL-ACP

3.4 Adaptação aos procedimentos de coleta de dados

Neste experimento, para padronizar o tempo de embarque, desembarque e coleta de dados, foi necessário um período de adaptação dos cavalos a estes procedimentos uma vez que os animais não eram adaptados ao transporte. Nesses treinos, os animais antes de serem submetidos ao embarque no caminhão, foram condicionados às coletas de sangue, saliva, e monitoramento dos parâmetros fisiológicos a fim de minimizar no dia do experimento o estresse relativo a estas coletas e ao embarque.

As coletas de sangue foram realizadas por punção na veia jugular com agulhas para tubos a vácuo (Vacutein®). Os equinos foram considerados adaptados as coletas de sangue quando não apresentarem reações de aversão às coletas e se mantiveram calmos.

Para as coletas de salivas, que foram realizadas com o uso de Salivettes®, os equinos tiveram suas bocas lavadas com água potável 30 minutos antes de cada coleta. Para adaptação à coleta de saliva foi necessário adaptar o cavalo a colocação de uma pinça hemostática com cotonete proveniente do tubo Salivette®. O animal foi adaptado à coleta dentro do caminhão de transporte. O animal que se apresentou calmo durante a colocação da pinça e sua movimentação dentro da boca, este foi considerado adaptado ao procedimento.

No Galpão dos Garanhões foi construído um embarcadouro sob medida para o embarque no caminhão do experimento. O embarcadouro é largo o suficiente para permitir que, nos treinos de embarque, o cavalo fique próximo a outro cavalo experiente, o que tranquiliza o animal e facilita o embarque. Nestes treinos, um animal experiente ao transporte embarcou primeiro e os animais do experimento embarcaram logo em seguida. O animal que embarcou sem auxílio de outro equino e sem uso de força, num período inferior a 1 minuto, foi considerado adaptado.

No dia do experimento todos os animais embarcaram sem uso de força ou maus tratos e sem a presença do cavalo experiente como guia.

No caminhão de transporte, os animais foram adaptados a ficarem presos nas ripas do caminhão com o cabresto. Foi colocado um equino voltado com a cabeça para direita e outro para esquerda até totalizar oito cavalos. Neste momento foi também efetuada a adaptação da coleta de saliva e lavagem da boca com os animais dentro do caminhão e foi feito o treinamento dos indivíduos que coletaram a saliva, cada indivíduo ficou posicionado de um lado do caminhão na parte de fora, apoiando os pés nas ripas. O cavalo foi considerado adaptado quando apresentou comportamento calmo com outro animal do seu lado, e não se mostrou aversivo à coleta de saliva.

3.5 Protocolo experimental

Os equinos foram retirados do pasto de origem no dia anterior ao experimento, levados e soltos no piquete do Galpão dos Garanhões, Setor de Equinocultura da UFRRJ, local onde foi executado o experimento.

No dia do experimento, oito equinos foram separados e colocados nas baias. Foi realizada a higiene da cavidade oral de cada animal com água potável para a retirada de eventuais impurezas, logo após a fita cardíaca Polar Equine® foi colocada e ativada. Após a ativação da fita, cada cavalo foi levado para o Hall do Galpão onde foram aferidas frequência respiratória e temperatura retal, foram coletadas amostras de sangue e saliva e aplicado o tratamento segundo o grupo previamente especificado. Todos os dados coletados foram anotados em formulários individuais próprios para cada animal, presentes no anexo 1.

Imediatamente após o tratamento, cada animal foi encaminhado para o embarque sem o uso de força ou indução de dor. No momento do embarque, um avaliador, que não conhecia a composição dos grupos, avaliou a reação do animal durante a entrada no caminhão.

Após o embarque do primeiro cavalo, foram iniciadas as coletas de sangue e saliva e o tratamento do segundo animal, e somente após o embarque do mesmo, os procedimentos iguais foram iniciados no terceiro animal e assim sucessivamente até que o oitavo equino foi embarcado.

Imediatamente após o embarque do oitavo equino, foi iniciado o transporte durante duas horas e trinta minutos na rodovia BR 465 e nas regiões vizinhas à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, realizando o mesmo trajeto em todas as viagens. Foram realizadas três coletas de saliva durante o transporte rodoviário, nos momentos 30, 70 e 100 minutos após o embarque. Para realizarmos as coletas de saliva de todos os animais foram gastos 10 minutos em cada momento.

Imediatamente após o desembarque foi coletado saliva e sangue dos animais. Trinta minutos após desembarque foi realizada uma nova coleta de saliva e sangue e, foi aferida a temperatura retal e a frequência respiratória. Após todas as coletas, foi retirada a fita cardíaca. O esquema do protocolo experimental está apresentado na figura 3.

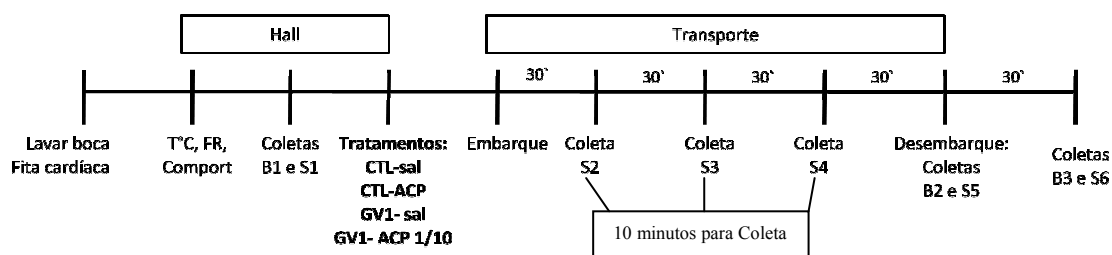


Figura 4: Esquema do protocolo experimental.

Todas os procedimentos do experimento foram realizadas no período da manhã entre 8:00 e 12:00.

3.6 Coletas de sangue e saliva

As coletas de sangue foram realizadas através do método de coleta com agulhas para tubos a vácuo (Vacutein®) diretamente na veia jugular. Os tubos com tampa roxa (com EDTA) e vermelha (soro) foram acondicionados sob refrigeração. No final do transporte o soro e o plasma foram centrifugados na velocidade 3200 RPM por 5 minutos e estocados em freezer a -20°C

As coletas de salivas foram realizadas com cotonetes específicos da marca (Salivette®, Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Alemanha). O Salivette® foi retirado do tubo próprio com uma pinça hemostática e introduzido pela comissura labial para dentro da boca do animal. Em seguida, o salivette foi deslizado sobre a língua por um minuto, até o cotonete estar totalmente úmido. Este procedimento foi bem tolerado por cavalos, pois os mesmos foram treinados, e foram realizados por pessoas treinadas. Após cada coleta, o Salivette® foi colocado no tubo próprio de polipropileno e estocado em gelo até o final do transporte. Os tubos foram então centrifugados no laboratório de Ciências Fisiológicas, na velocidade de 5000RPM por 10 minutos. As amostras de saliva foram estocadas em freezer a -20°C.

3.7 Transporte rodoviário

Os cavalos foram transportados durante duas horas e meia, no trajeto que envolve a Rodovia BR 465 e as regiões vizinhas à UFRRJ, sempre pelo mesmo caminho. A média da temperatura ambiente durante as quatro viagens foi de 27 a 30°C.

O caminhão utilizado no transporte foi cedido pela UFRRJ. Trata-se de um veículo (marca Ford) possui uma gaiola semi-aberta que permite o contato dos animais com o ambiente e a entrada de luz e chuva. Dentro da gaiola os animais podem ficar soltos ou presos por uma corda (cabresto) às ripas externas, não havendo separação física dentro da mesma. O assoalho da gaiola contém estrados para auxiliar o animal ficar em estação. Figura 5



Figura 5: Fotografias do embarcadouro e do caminhão de transporte nos momentos de embarque no caminhão (foto do autor).

3.8 Avaliação comportamental

A avaliação comportamental foi realizada durante e depois do estresse de transporte por dois pesquisadores treinados e experientes em análise comportamental de cavalos. As médias das notas dos pesquisadores foram utilizadas para se obter o escore de atividade comportamental.

Para análise da atividade comportamental foi construído uma escala com 7 graus de atividade/vigília, onde o escore 1 indica grande sedação enquanto que o escore 6 significa altos níveis de vigília/agitação. Quadro 2.

Quadro 2: Escores atribuídos para o grau de atividade

Graus de atividade	Comportamentos observados
Escore 1 (sedação +++)	Nada reativo e com abaixamento de cabeça intenso
Escore 2 (sedação ++)	Pouco reativo e com considerável abaixamento de cabeça
Escore 3 (sedação +)	Pouco reativo e com pequeno abaixamento de cabeça
Escore 4 (normal/tranquilo)	Alerta sem apresentar sinais de agitação
Escore 5 (agitação +)	Agitado (resistente a manipulação)
Escore 6 (agitação ++)	Muito agitado e agressivo

3.9 Mensuração da temperatura corporal e frequência respiratória

A temperatura corporal foi aferida na região anal com o uso do termômetro digital da Incontern® sempre pelo mesmo pesquisador. A temperatura foi medida em dois momentos: no momento basal antes do B1 (primeira coleta de sangue), quando todos os animais já estavam palanqueados no salão principal e no momento após o desembarque, após coleta B2 (segunda coleta de sangue).

A frequência respiratória foi aferida sempre o mesmo pesquisador, contando os movimentos abdominais de expiração durante 1 minuto, e os dados representados como Número de Movimentos Respiratórios por Minuto (MRM). A frequência respiratória foi medida sempre antes da mensuração da temperatura retal, que antecederam os momentos B1 e B2.

3.10 Uso dos frequencímetros

A frequência cardíaca foi registrada com o frequencímetro utilizando um sistema de gravação móvel (RS 800, Polar Equine®), ligado ao tórax do cavalo por uma cinta elástica. Nesta cinta existem dois eletrodos (um para região precordial, no tórax abaixo do codilho esquerdo e outro eletrodo próximo a cernelha na região torácica). O transmissor capta os sinais dos eletrodos e envia para um relógio que armazena estes dados. É importante que a região do eletrodo seja abundantemente umedecida com água, para garantir a condução dos impulsos elétricos. Os dados de frequência cardíaca captada pelo frequencímetro foi armazenada no relógio Polar Equine específico e único para cada cavalo. Figura 6.



Figura 6: Frequencímetro Polar Equine modelo (Equine RS800cx). Ilustração do fabricante. (Polar Equine®,2011).

3.11 Análise da Frequência cardíaca

Os dados armazenados em cada relógio foram enviados para um computador por meio de uma interface IR® de emissão de infravermelhos e para que se pudesse proceder às análises da frequência cardíaca pelo uso do programa Polar Pro Trainer 5®. Figura 7.

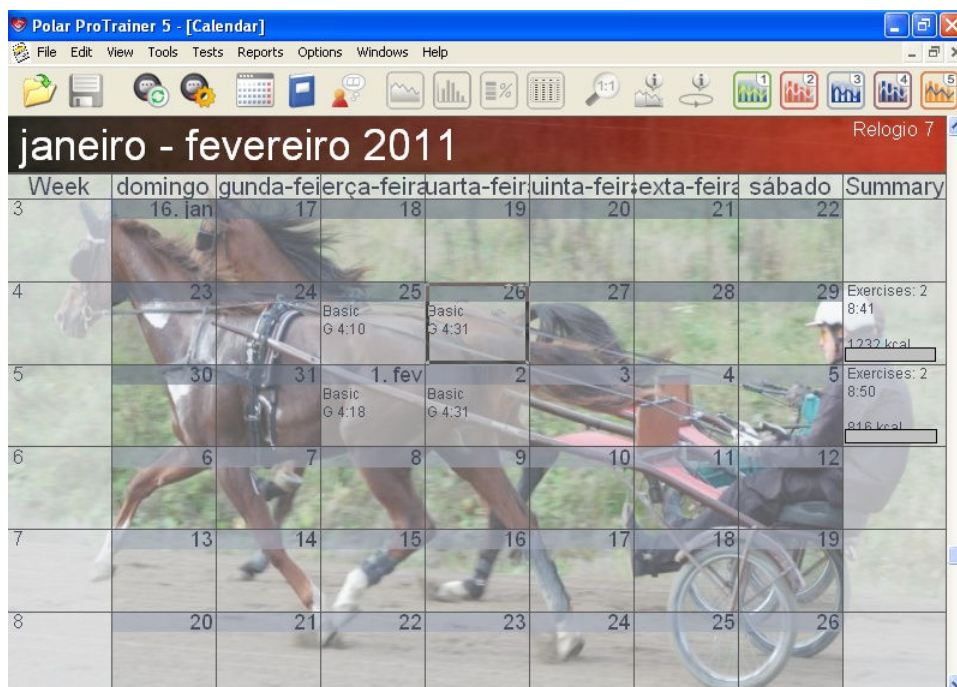


Figura 7: Programa Polar Pro Trainer Equine Edition®, onde os dados são apresentados dentro de um calendário de exercícios para cada animal. Fonte: Polar Pro Trainer Equine Edition®.

Os dados das variações de frequência cardíaca de cada exercício são apresentados em um gráfico de acordo com o tempo (ver figura 8). No presente estudo, foram analisados os valores máximo, mínimo e médio das frequências cardíacas durante o minuto inicial de cada procedimento realizado nos animais nos seguintes momentos: S1 (coleta de saliva 1), E (embarque), TI (início do transporte), S2, S3 e S4 (coletas de saliva 2, 3 e 4), desembarque e S5 e S6 (coleta de saliva 5 e 6). Como mensuração basal foram coletados os valores de frequência cardíaca máximo, mínimo e médio durante o período que o animal esperou palanqueado o início dos procedimentos de coletas.

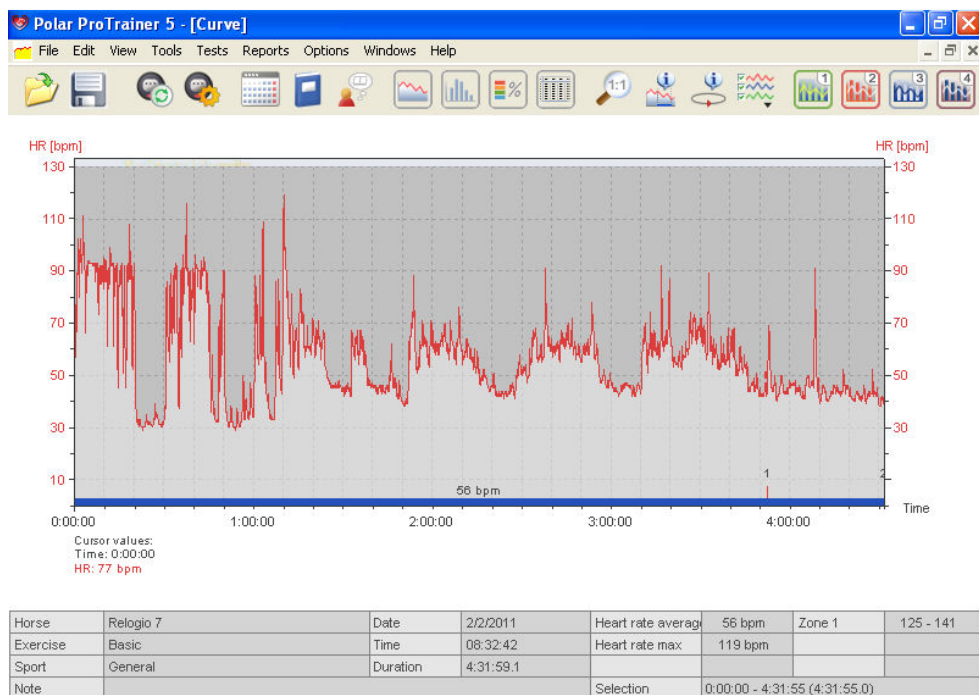


Figura 8: Quadro do programa Polar Pro Trainer Equine Edition®, onde os dados de frequência cardíaca de cada exercício são apresentados em razão do tempo. Fonte: Polar Pro Trainer Equine Edition®.

3.12 Análise do cortisol

O sangue coletado em cada etapa foi acondicionado em tubos sem anticoagulante para obtenção do soro. O soro foi obtido através da centrifugação do material a 4600RPM durante 20-30 minutos. A análise do cortisol foi realizada no laboratório de Endocrinologia Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro pela técnica de Radioimunoensaio (RIE) com o Kit *RD Coated Tube Cortisol I¹²⁵ RIA*.

Após descongelamento das amostras à temperatura ambiente e numeração dos tubos, foi pipetado em duplicata, 25µL de diferentes concentrações padrões de cortisol do kit (0, 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 3; 10; 30; 100 µg/dL) nos tubos, adicionando-se 25µL dos soros testes (em duplicatas) e em seguida testados e depois foi adicionado 1,0 ml de Cortisol I¹²⁵ em todos os tubos e agitado. Os tubos foram incubados em banho-maria por 45 minutos a 37°C +/- 1°C sendo feita em seguida a decantação e secagem de todos os tubos utilizando um papel absorvente. A contagem foi realizada num contador gama calibrado para iodo radiativo (I¹²⁵) da marca Wallac ® (figura 9).

Após as leituras, foi confeccionado o gráfico da curva padrão de acordo com as instruções do kit e os valores de cortisol das amostras testadas, foram calculados a partir dos valores de radioatividade obtidos individualmente em relação aos valores da curva padrão. Os cálculos dos valores testes apresentados em µg/dL foram realizados através do programa Graph Prism 5.0. Para a manutenção da confiabilidade do teste, todos os valores testes devem estar dentro dos valores da curva padrão, não podendo ser considerados os valores fora da curva. As variações intra e extra-ensaio foram de 2,4% e 6,8% respectivamente.

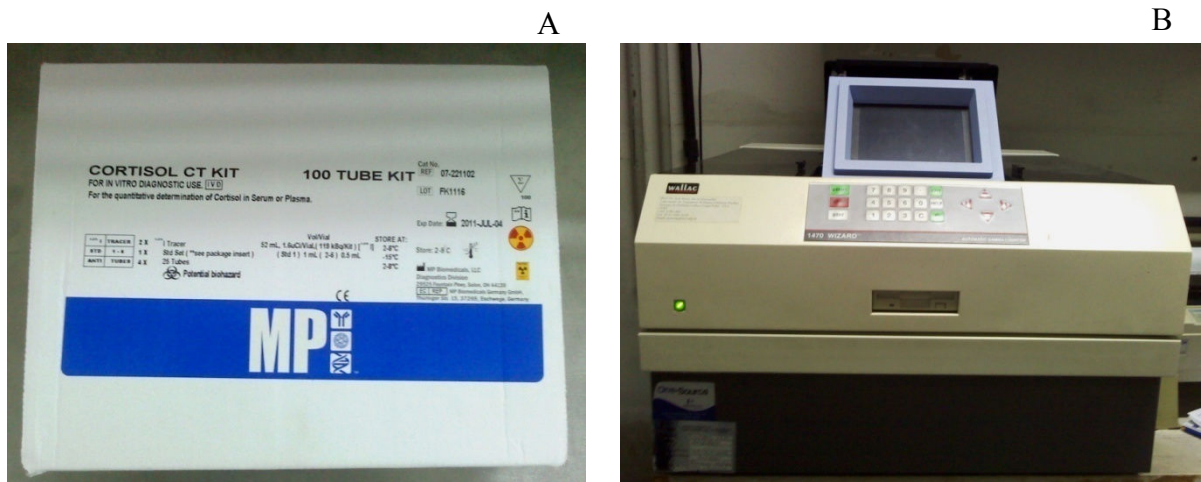


Figura 9: Em A fotografia do Kit de Radioimunoensaio e B o contador Gama utilizados no experimento.

3.13 Estatística

Para as análises de frequência cardíaca, temperatura, frequência respiratória e níveis de cortisol sérico, os dados foram apresentados como média \pm erro padrão e foi utilizada a Anova para medidas repetidas seguida de teste de Student-Newman-Keuls. Foram analisadas as variáveis: tratamento, tempo, viagem e posição no caminhão.

Para a análise comportamental, os dados semi-quantitativos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis.

Para análise estatística foi utilizado o programa Sigma Stat 3.0, e, para confecção dos gráficos, foi utilizado Graph Pad Prisma 4 Project.

4. RESULTADOS

4.1 Análise da Frequência Cardíaca durante o estresse de transporte

Os valores da Frequência Cardíaca Média (FC Med), Máxima (FC Max) e Mínima (FC Min) nos tempos: basal, S1 (coleta de saliva 1), E (embarque), TI (início do transporte), S2, S3 e S4 (coletas de saliva 2, 3 e 4), DE (desembarque) e S5 e S6 (coleta de saliva 5 e 6) estão apresentadas nas figuras 10(A) e 10(B) e 11.

De uma maneira geral, os valores de FC Med, FC Max e FC Min variaram com o tempo. Os maiores valores da FC Med são observados nos momentos de embarque e desembarque, pode-se então considerar estes como os momentos de maior estresse para os animais. A análise estatística foi efetuada considerando apenas os tempos a partir de S2, pois o tempo basal e S1 são anteriores ao tratamento; e E e TI são muito próximos ao tratamento não sendo provável observar os efeitos dos tratamentos nesses momentos.

Para análise dos dados obtidos na FC Med a Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores tratamento (CTL-SAL, CTL-ACP1%, VG1-SAL e VG1-ACP 1/10) ($F_{(3,168)} = 3,276$; $P=0,036$) e tempo (S2, S3, S4, TF, DE, S5 e S6) ($F_{(6,168)} = 7,451$; $P<0,001$), sem detectar significância da interação. O teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls não detectou diferenças significativas entre os grupos quando foram considerados os diferentes tempos estudados. Figura 10(A). No entanto quando o fator tempo foi desconsiderado, os grupos apresentaram as seguintes médias para FC Med: CTL-SAL (66,78 BPM), CTL-ACP 1% (60,94 BPM), VG1-SAL (58,05 BPM), VG1-ACP 1/10 (50,19 BPM) e o teste de Student-Newman-Keuls foi capaz de identificar diferença apenas entre os grupos CTL-SAL e VG1-ACP 1/10 ($P=0,023$). Desta forma, podemos sugerir que a aplicação de 1/10 da dose de acepromazina no ponto VG1 foi capaz de reduzir a FC Med em cavalos submetidos ao estresse de transporte. Figura 10(B).

Usando a mesma análise para o fator tempo, onde não consideramos o fator tratamento, a FC Med no momento DE foi significativamente maior que nos tempos S2 ($P<0,001$), S3 ($P=0,007$), S4 ($P<0,001$), S5 ($P=0,003$), e S6 ($P<0,001$), enquanto que a FC Med do TF foi significativamente maior que nos tempos S2 ($P=0,015$) e S6 ($P<0,001$). O que indica que os momentos TF e DE produziram FC Med maiores que os demais tempos analisados.

As análises da influência da repetição da viagem (viagem 1 e 2) e da posição do animal no caminhão (posições relativas a ordem de embarque de 1 a 8) foram realizadas através da Anova de duas vias para medidas repetidas com os fatores: viagem *versus* tempo ou posição no caminhão *versus* tempo. Neste caso não foram detectadas diferenças significativas nos fatores viagem ($F_{(1,180)}=1,221$; $p=0,278$) e posição no caminhão ($F_{(7,144)}=0,750$; $p=0,63$). O que demonstra que a posição no caminhão ou a repetição da viagem não foram capazes de interferir na FC Med de equinos submetidos ao estresse de transporte.

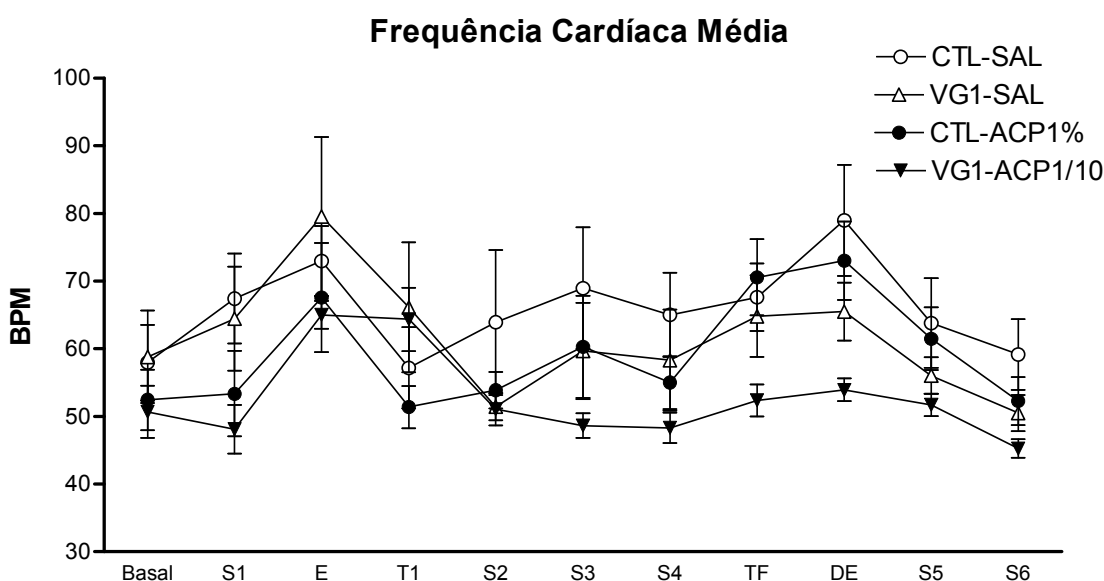


Figura 10(A): Efeito da fármaco-acupuntura na Frequência Cardíaca média de equinos submetidos ao estresse de transporte rodoviário. Os dados são apresentados como BPM (batimentos por minuto) \pm epm nos momentos basal, E (embarque), TI (início do transporte), TF (fim do transporte), DE (desembarque) e nas coletas de saliva S1 a S6. Os animais receberam os seguintes tratamentos: CTL-SAL (0.01 ml kg^{-1} de solução salina IM na tábua do pescoço); CTL-ACP (0.1 mg kg^{-1} de Acepromazina IM na tábua do pescoço); VG1-SAL (0.01 ml kg^{-1} de salina no ponto VG1) e VG1-ACP 1/10 (0.01 mg kg^{-1} de Acepromazina 1% (1/10 da dose recomendada) no ponto VG1). Para análise dos dados obtidos na FC Med a Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores tratamento. O teste de Student-Newman-Keuls foi capaz de identificar diferença apenas entre os grupos CTL-SAL e VG1-ACP 1/10 ($P=0,023$). Usando a mesma análise para o fator tempo os momentos TF e DE produziram FC Med maiores que os demais tempos analisados.

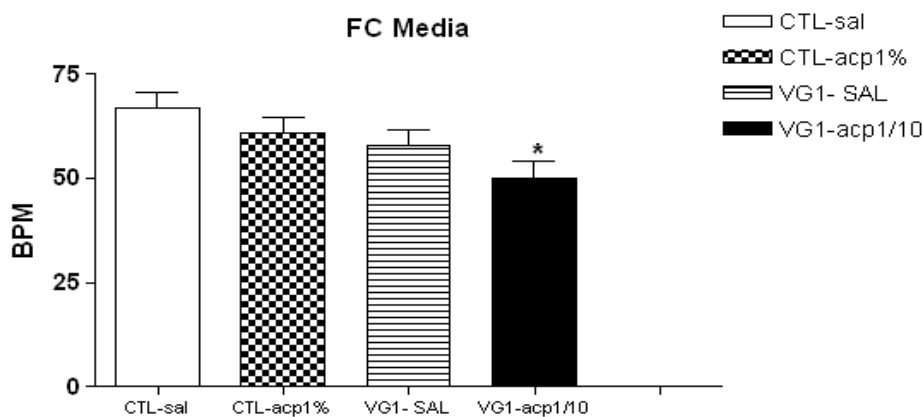


Figura 10 (B): Efeito da fármaco-acupuntura na Frequência Cardíaca Média de equinos submetidos ao estresse de transporte rodoviário, considerando apenas o fator tratamento. Os dados são apresentados como BPM (batimentos por minuto) \pm epm nos diferentes tratamentos CTL-SAL (0.01 ml kg^{-1} de solução salina IM na tábua do pescoço); CTL-ACP (0.1 mg kg^{-1} de Acepromazina IM na tábua do pescoço); VG1-SAL (0.01 ml kg^{-1} de salina no ponto VG1) e VG1-ACP 1/10 (0.01 mg kg^{-1} de Acepromazina 1% (1/10 da dose recomendada) no ponto VG1). Para análise dos dados obtidos na FC Med a Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa nos fatores tratamento. O teste de Student-Newman-Keuls foi capaz de identificar diferença apenas entre os grupos CTL-SAL e VG1-ACP 1/10 ($P=0,023$).

A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferenças significativas no fator tratamento para FC Min ($F_{(3, 280)} = 1,731$; $P=0,183$), e para FC Max ($F_{(3, 280)} = 1,245$; $P=0,312$), sendo detectado diferenças significativas apenas no fator tempo para FC Min ($F_{(10, 280)} = 9,221$; $P<0,001$) e FC Max ($F_{(10, 280)} = 20,896$; $P<0,001$), para todos os momentos

analisados. O que demonstra que os tratamentos não foram capazes de alterar a FC Max e nem a FC Min de equinos submetidos ao transporte rodoviário (Figura 11).

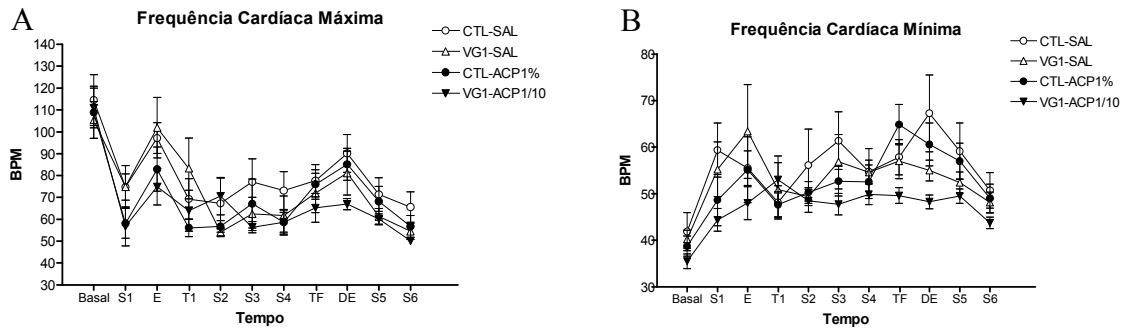


Figura 11: Efeito da fármaco-acupuntura na Frequência Cardíaca Máxima (A) e Mínima (B) de equinos submetidos ao estresse de transporte rodoviário. Os dados são apresentados como BPM (batimentos por minuto) \pm epm nos momentos basal, E (embarque), TI (início do transporte), TF (fim do transporte), DE (desembarque) e nas coletas de saliva S1 a S6. Os animais receberam os seguintes tratamentos: CTL-SAL (0.01 ml kg^{-1} de solução salina IM na tábua do pescoço); CTL-ACP (0.1 mg kg^{-1} de Acepromazina IM na tábua do pescoço); VG1-SAL (0.01 ml kg^{-1} de salina no ponto VG1) e VG1-ACP 1/10 (0.01 mg kg^{-1} de Acepromazina 1% (1/10 da dose recomendada) no ponto VG1). A ANOVA de duas vias para medidas repetidas não detectou diferenças significativas no fator tratamento para FC Min e para FC Max, sendo detectado diferença significativas apenas no fator tempo para FC ($P < 0,001$) e FC Max ($P < 0,001$), para todos os momentos analisados.

4.2 Análise da Temperatura Corporal

Na análise da temperatura corporal, Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator tempo (variáveis temperatura corporal final e inicial) ($F_{(1, 28)} = 23,101$; $P < 0,001$). No entanto, não foi detectada diferença significativa nos fatores grupo ($F_{(3, 28)} = 0,791$; $P = 0,509$) e na interação ($F_{(3, 28)} = 1,289$; $P = 0,297$). Figura 12.

O teste de Student-Newman-Keuls quando o fator grupo foi desconsiderado, detectou diferença entre os tempos final e inicial e ($P < 0,001$), onde as médias da temperatura final foi $37,956$ °C e a inicial foi de $37,444$ °C. Este aumento significativo na temperatura corporal provavelmente foi decorrente do aumento da temperatura ambiente e do estresse de transporte.

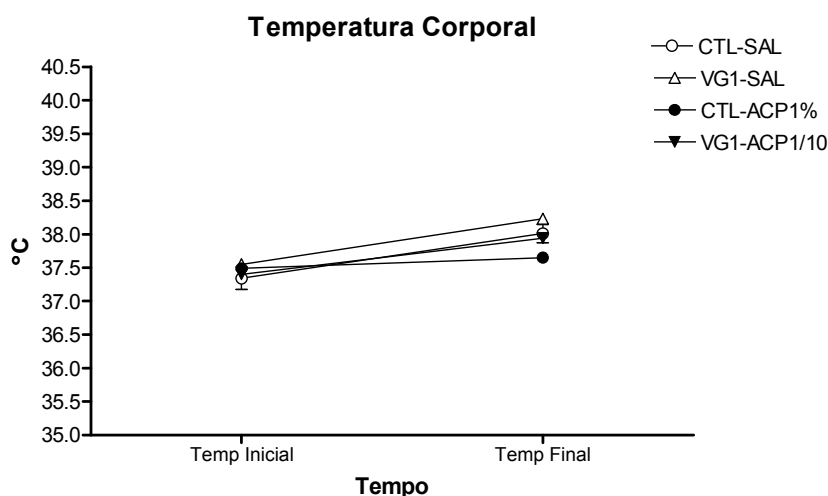


Figura 12: Efeito da fármaco-acupuntura na temperatura corporal média dos animais submetidos ao estresse. Demonstra a temperatura corporal em °C (graus Celsius) antes e após o transporte rodoviário de equinos. Grupo Controle Negativo (CTL-SAL): $0,01 \text{ ml kg}^{-1}$ de solução salina administrado por via intramuscular na tábua do pescoço. Grupo Controle Positivo (CTL-ACP): $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de Acepromazina 1% administrado por via intramuscular na tábua do pescoço. Grupo Aqua-acupuntura (VG1-SAL): $0,01 \text{ ml kg}^{-1}$ de salina administrado no ponto de Acupuntura VG1. Grupo Fármaco-acupuntura (VG1-ACP 1/10): $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ de Acepromazina 1% (1/10 da dose recomendada) administrado no ponto de Acupuntura VG1.

4.3 Análise da Frequência Respiratória

Na análise da frequência respiratória, Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator tempo (variáveis frequência respiratória final e inicial) ($F_{(1, 28)} = 47,972$; $P < 0,001$), e na interação ($F_{(3, 28)} = 5,204$; $P = 0,006$). No entanto, não foi detectada diferença significativa no fator grupo ($F_{(3, 28)} = 1,930$; $P = 0,148$) Figura 13.

O teste de Student-Newman-Keuls quando o fator grupo foi desconsiderado, detectou diferença entre os tempos final e inicial ($P < 0,001$), onde as médias da frequência final foi $36,500$ e a inicial foi de $25,500$. Na interação entre o fator tempo e o grupo observa-se diferença significativa na média da frequência respiratória final versus a inicial nos seguintes grupos: CTL-SAL, VG1-SAL e VG1-ACP 1/10 ($P < 0,001$), indicando que nestes grupos o estresse aumentou a FR. No grupo CTL-ACP 1% ($P = 0,876$) não há diferença significativa entre a média da frequência respiratória final e a inicial sugerindo que o ACP inibiu o aumento da FR induzida pelo estresse.

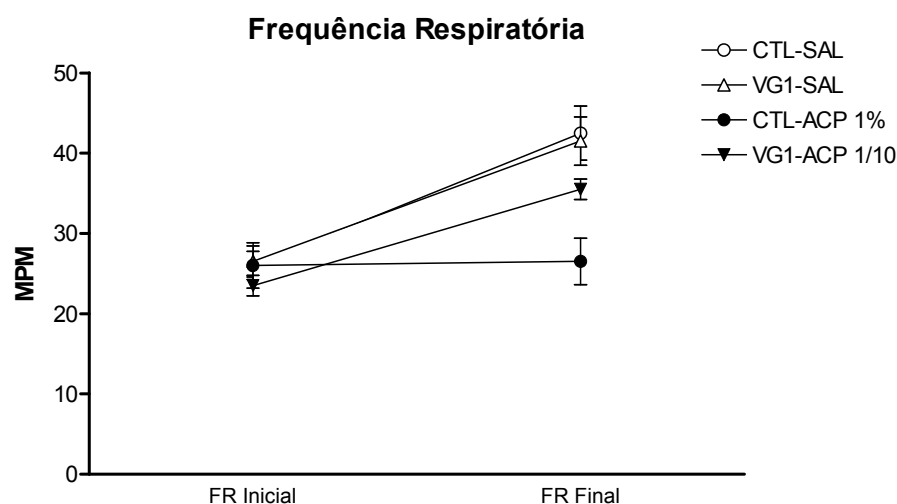


Figura 13: Efeito da fármaco-acupuntura na Frequência Respiratória média dos animais submetidos ao estresse. Demonstra a frequência respiratória em RPM (movimentos respiratórios por minuto) antes e após o transporte rodoviário de equinos. Grupo Controle Negativo (CTL-SAL): 0.01 ml kg^{-1} de solução salina administrado por via intramuscular na tábua do pescoço. Grupo Controle Positivo (CTL-ACP): 0.1 mg kg^{-1} de Acepromazina 1% administrado por via intramuscular na tábua do pescoço. Grupo Aqua-acupuntura (VG1-SAL): 0.01 ml kg^{-1} de salina administrado no ponto de Acupuntura VG1. Grupo Fármaco-acupuntura (VG1-ACP 1/10): 0.01 mg kg^{-1} de Acepromazina 1% (1/10 da dose recomendada) administrado no ponto de Acupuntura VG1. Na análise da frequência respiratória, Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator tempo (variáveis frequência respiratória final e inicial) ($P < 0,001$), e na interação ($P = 0,006$). No entanto, não foi detectada diferença significativa no fator grupo ($P = 0,148$).

4.4 Análise da Atividade Comportamental

Os equinos foram condicionados através dos treinos prévios, sendo assim todos estavam tranquilos nas coletas e demoraram cerca de 1 minuto para o embarque, sem problemas.

Na análise do grau de atividade durante o transporte, o teste de Kruskal-Wallis detectou diferença significativa entre os grupos ($P = 0,002$), enquanto que a mesma análise foi realizada para o período, depois não foi detectada diferença significativa ($P = 0,360$). Figura 14.

A comparação entre pares de grupos (teste Student-Newman-Keuls) mostrou que o grupo CTL-ACP 1% foi diferente dos demais grupos, enquanto estes não foram diferentes entre si. Estes dados sugerem que a ACP produziu sedação significativa, enquanto que o VG1-ACP1/10 não produziu alteração de comportamento.

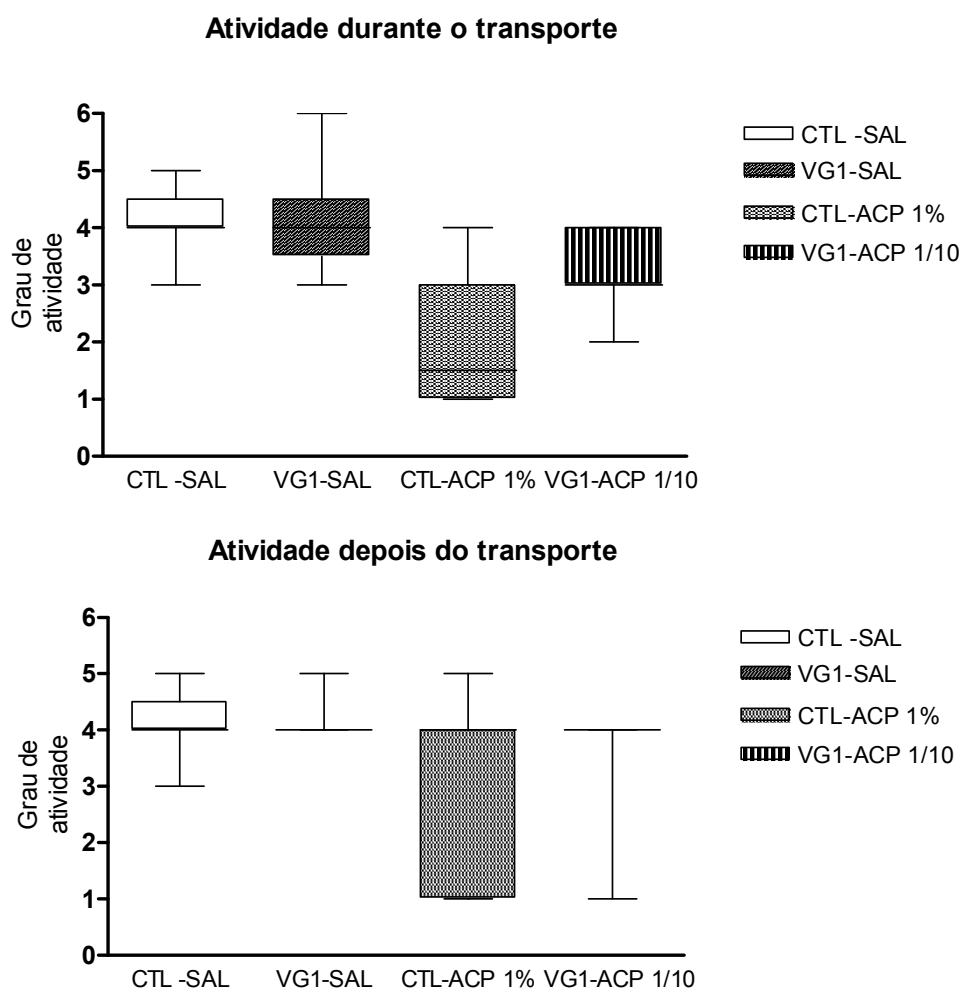


Figura 14: Efeito da fármaco-acupuntura na Atividade Comportamental Média dos animais submetidos ao estresse. Demonstra os diferentes graus de atividade comportamental antes, durante e após o transporte rodoviário de equinos. Grupo Controle Negativo (CTL-SAL): 0.01 ml kg⁻¹ de solução salina administrado por via intramuscular na tábua do pescoço. Grupo Controle Positivo (CTL-ACP): 0.1 mg kg⁻¹ de Acepromazina 1% administrado por via intramuscular na tábua do pescoço. Grupo Aqua-acupuntura (VG1-SAL): 0.01 ml kg⁻¹ de salina administrada no ponto de Acupuntura VG1. Grupo Fármaco-acupuntura (VG1-ACP 1/10): 0.01 mg kg⁻¹ de Acepromazina 1% (1/10 da dose recomendada) administrado no ponto de Acupuntura VG1. Na análise do grau de atividade durante o transporte, o teste de Kruskal-Wallis detectou diferença significativa entre os grupos (P= 0,002), enquanto que a mesma análise foi realizada para o período, depois não foi detectada diferença significativa(P= 0,360). A comparação entre pares de grupos (teste Student-Newman-Keuls) mostrou que o grupo CTL-ACP 1% foi diferente dos demais grupos, enquanto estes não foram diferentes entre si.

4.5 Análise do cortisol sérico e salivar

4.5.1 Análise do cortisol sérico

Na análise dos níveis de cortisol sérico, Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator tempo (B1,B2,B3) ($F_{(2, 56)} = 30,120$; $P < 0,001$). No entanto, não foi detectada diferença significativa nos fatores grupo ($F_{(3, 56)} = 0,131$; $P = 0,941$) e na interação ($F_{(6, 56)} = 0,869$; $P = 0,523$). Figura 15.

O teste de Student-Newman-Keuls quando o fator grupo foi desconsiderado, detectou diferença entre os tempos B2 e os demais (B1 e B3) ($P < 0,001$). O momento B2 (coleta logo

após o desembarque) apresentou o maior nível de cortisol sérico, indicando que o transporte para todos os grupos foi um fator de estresse. O momento B3 (coleta meia hora após o desembarque) representa que neste momento os cavalos já se encontram mais calmos, não havendo diferença significativa entre os níveis basais B1(coleta antes do embarque).

As análises da influência da repetição da viagem (viagem um e dois) e da posição do animal no caminhão (posições relativas a ordem de embarque de 1 a 8) foram realizadas através da Anova de duas vias para medidas repetidas com os fatores: viagem *versus* tempo ou posição no caminhão *versus* tempo. Não foi detectado diferença significativa no fator posição no caminhão ($F_{(7, 48)} = 1,590$; $P = 0,186$). Porém o fator viagem apresentou significância ($F_{(1,60)} = 8,963$; $P = 0,005$), com médias de $2,621\mu\text{g/dL}$ na viagem 1 e $3,986\mu\text{g/dL}$ na viagem 2. O que demonstra que a posição no caminhão não foi capaz de interferir nos níveis de cortisol sérico de equinos submetidos ao estresse de transporte, porém a segunda viagem produzir maiores níveis de estresse.

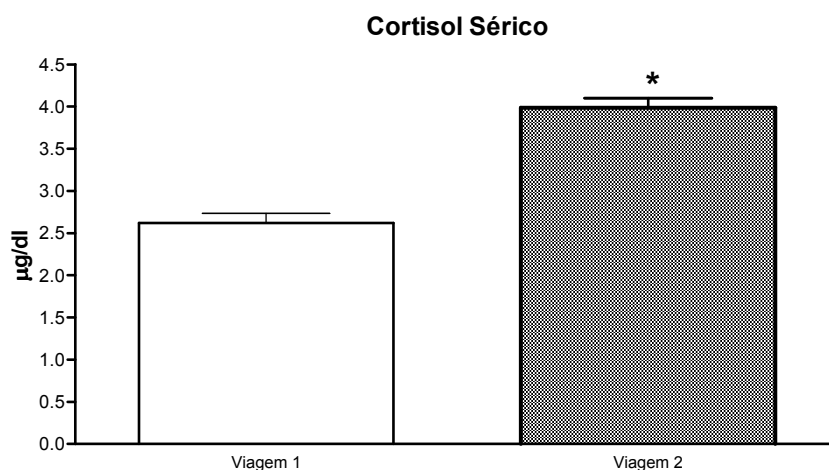


Figura 15: Efeito das viagens na concentração de Cortisol Sérico dos animais submetidos ao estresse. O fator viagem apresentou significância ($F_{(1,60)} = 8,963$; $P = 0,005$), com médias de $2,621\mu\text{g/dL}$ na viagem 1 e $3,986\mu\text{g/dL}$ na viagem 2. O que demonstra que a posição no caminhão não foi capaz de interferir nos níveis de cortisol sérico de equinos submetidos ao estresse de transporte, porém a segunda viagem produzir maiores níveis de estresse

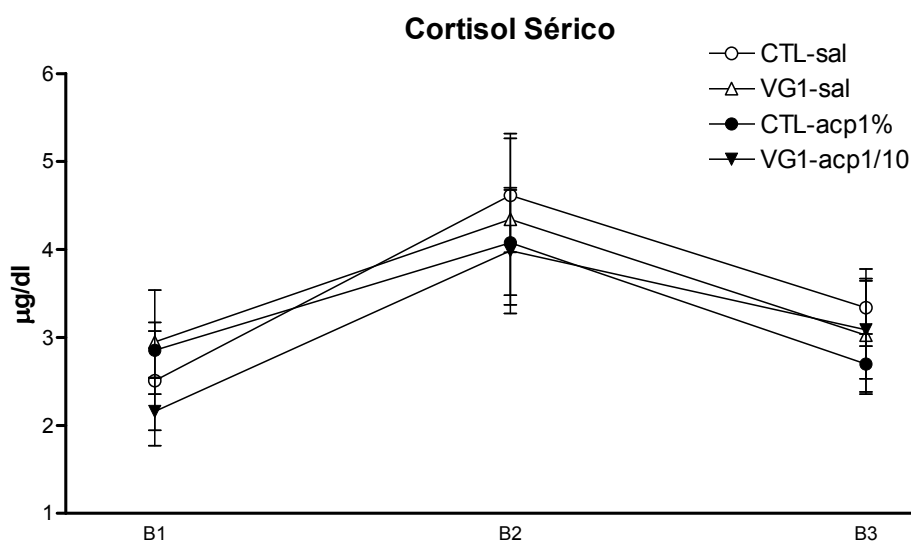


Figura 16: Efeito da fármaco-acupuntura na concentração de Cortisol Sérico dos animais submetidos ao estresse. Demonstra o cortisol sérico em $\mu\text{g/dl}$ antes e após o transporte rodoviário de equinos nos momentos de coleta sanguínea B1 (antes do embarque), B2 (logo após o desembarque) e B3 (meia hora após o desembarque). Grupo Controle Negativo (CTL-SAL): 0.01 ml kg^{-1} de solução salina administrado por via intramuscular na tábua do pescoço. Grupo Controle Positivo (CTL-ACP): 0.1 mg kg^{-1} de Acepromazina 1% administrado por via intramuscular na tábua do pescoço. Grupo Aqua-acupuntura (VG1-SAL): 0.01 ml kg^{-1} de salina administrada no ponto de Acupuntura VG1. Grupo Fármaco-acupuntura (VG1-ACP 1/10): 0.01 mg kg^{-1} de Acepromazina 1% (1/10 da dose recomendada) administrado no ponto de Acupuntura VG1. Na análise dos níveis de cortisol sérico, Anova de duas vias para medidas repetidas detectou diferença significativa no fator tempo (variáveis: frequência respiratória final e inicial ($P < 0,001$)). No entanto, não foi detectada diferença significativa nos fatores grupo ($P = 0,941$) e na interação ($P = 0,523$). O teste de Student-Newman-Keuls quando o fator grupo foi desconsiderado, detectou diferença entre os tempos B2 e os demais (B1 e B3) ($P < 0,001$).

4.5.2 Análise do cortisol salivar

O cortisol salivar foi também avaliado por Radioimunoensaio, porém os valores encontrados estavam fora da curva padrão, ou seja, abaixo dos valores mínimos de detecção do teste. O método empregado, mesmo com a confecção de uma curva padrão adaptada aos valores de cortisol em equinos, não foi eficiente para detectar o cortisol salivar neste experimento.

5. DISCUSSÃO

Neste experimento, a frequência cardíaca média, máxima e mínima, a temperatura corporal, a frequência respiratória, a atividade comportamental e o cortisol sérico foram analisados em cavalos submetidos a quatro diferentes tratamentos (CTL-SAL, CTL-ACP 1%, VG1-SAL, VG1 ACP1/10) realizados antes do transporte rodoviário de 2,5 horas. O objetivo do trabalho foi encontrar técnicas para minimizar o estresse de transporte, sugerindo uso de um décimo da dose de acepromazina no ponto de acupuntura VG1(VG1-ACP 1/10) e o uso de condutas não agressivas ao realizar o embarque, o transporte e desembarque dos animais. Cada cavalo foi submetido a duas viagens, com um intervalo de uma semana entre cada uma para garantir a ausência de efeitos residuais da acepromazina, da acupuntura e do estresse (CHOU et al., 2002; MIKSA; CUMMINGS; POPPENGA, 2005). Além disto, os animais foram randomizados quanto aos tratamentos e posições no caminhão.

5.1 Frequência Cardíaca durante o estresse de transporte

Nossos resultados mostram que os valores de FC variaram com o tempo nos diversos momentos mensurados neste experimento. Os períodos de embarque e desembarque promoveram os maiores aumentos nas FC Med, FC Min e FC Max. Estes aumentos devem estar relacionados aos momentos de maior estresse e também de maior movimentação dos animais, o que conseqüentemente levaria a aumentos da FC. Elevações na FC de cavalos durante o transporte rodoviário foram observadas em diversos estudos anteriores (CLARK; FRIEND; DELLMEIER, 1993; WARAN, 1993; SMITH et al., 1994; WARAN; CUDDEFORD, 1995; WARAN, 1993; WARAN, 1996; OHMURA; HIRAGA; AIDA, 2006). Schimidt e colaboradores (2010) demonstraram um aumento significativo da frequência cardíaca média, principalmente no momento inicial do transporte, com permanência desta elevação durante o transporte, quando comparada aos valores basais. Outros autores também encontram mudanças na frequência cardíaca inicial, entretanto com um declínio durante o transporte (WARAN e CUDDEFORD, 1995; WARAN, 1993, WARAN, 1996). Estas elevações na FC indicam que o embarque dos cavalos pode ser o momento mais estressante do transporte (SHANAHAN, 2003).

A mensuração da FC como índice de estresse tem limitações. A FC, em indivíduos saudáveis, em qualquer momento da vida representa as interações entre a regulação vagal (que reduz a FC) e a simpática (que aumenta FC). Em repouso, a regulação vagal domina, enquanto que o aumento da atividade física é frequentemente caracterizado pela diminuição vagal e aumento da influência simpática. Um aumento no FC é causado principalmente por um aumento da atividade simpática (HAINSWORTH, 1995), mas pode também resultar de uma diminuição na regulação vagal ou a partir de mudanças simultâneas em ambos os sistemas de regulação (VON BORELL et al., 2007).

Efeitos separados dos dois ramos do sistema nervoso autônomo não podem ser determinados por simples adição ou subtração dos componentes relativos (HAINSWORTH, 1995). De fato, os ramos não necessariamente funcionam como um contínuo, na regulação da atividade cardíaca, onde um aumento em um ramo resulta na diminuição do outro. Ao contrário, eles têm a capacidade de se comportarem de forma síncrona ou independente um do outro, possibilitando múltiplos padrões de ativação. Portanto, é difícil avaliar as atividades características regulatórias do SNA com a simples mensuração da FC. Aumento da FC pode resultar da redução da atividade vagal, bem como de aumento da atividade simpática ou, na

maioria dos casos, de uma combinação de alterações simultâneas da atividade de ambos os ramos. Na realidade, porém, a interação entre os ramos é bastante complexa, e os parâmetros de FC Med fornecem informações sobre os efeitos líquidos de todos os componentes na atividade cardíaca e são de uso limitado para avaliar com precisão a regulação simpático-vagal (VON BORELL et al., 2007).

A análise da VFC, por outro lado, permite uma determinação muito mais precisa e detalhada da regulação funcional do SNA. VFC é um indicador particularmente bom para a avaliação não invasiva da atividade SNA, em resposta a estresse psicológico e fisiológico (STAUSS, 2003). Estados psicológicos podem ter um impacto no balanço simpático-vagal na ausência de quaisquer mudanças palpáveis em frequência cardíaca e/ou respiração (STAUSS, 2003).

Apesar das limitações do uso da FC como indicador de atividade autonômica e de estresse, a FC pode ser considerada como um índice indireto de estresse, principalmente se analisada em conjunto com outros parâmetros. No presente estudo, todos os animais foram submetidos ao mesmo tipo de estresse e o principal objetivo foi demonstrar se os tratamentos (farmacopuntura e acepromazina) poderiam alterar as respostas de estresse. Neste sentido, a injeção de 1/10 da dose de acepromazina no ponto de acupuntura VG1 foi capaz de reduzir a FC Med quando comparada ao controle da salina (injeção de salina na tábua do pescoço). A injeção de salina no VG1 ou mesmo a aplicação da dose usual de acepromazina (0.1 mg kg⁻¹ IM, na tábua do pescoço) não foram capazes de alterar a FC média (Figura 10). Estes resultados são obtidos apenas quando foi analisado o fator tratamento independentemente do fator tempo, ou seja, todos os tempos são considerados em conjunto e foi obtido apenas um valor de FC Med para cada grupo (e não valores de FC em cada tempo S2, S3, etc para cada grupo).

Luna e colaboradores (2008) utilizando os mesmos grupos experimentais do presente experimento, num estudo sobre o efeito da fármaco-acupuntura sobre o grau de sedação de equinos, não observaram diferenças na frequência cardíaca entre os tratamentos utilizados. No entanto, o trabalho de Luna foi realizado em animais em repouso (sem estresse) e com a aferição da frequência cardíaca realizada somente em alguns momentos com o auxílio de um estetoscópio. No presente estudo, a FC foi aferida com o uso de um frequencímetro cardíaco (Polar Equine) durante todo o processo experimental, em animais submetidos ao estresse de transporte.

O efeito da fármaco-acupuntura no VG1 sobre a FC Med de animais submetidos ao estresse de transporte pode estar relacionada à ação da acupuntura diretamente sobre o SNA e conseqüentemente sobre o sistema cardiovascular, ou indiretamente sobre as estruturas centrais relacionadas à 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 à inibição simpática (MIDDLEKAUFF; YU; HUI, 2001). Por outro lado, a modulação do sistema cardiovascular pela acupuntura também tem sido relacionada à 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).

Como foi dito anteriormente, no presente estudo, acepromazina (0.1 mg kg⁻¹ IM, na tábua do pescoço) não foi capaz de alterar a FC de equinos submetidos ao transporte rodoviário. Bergeron e colaboradores 2006 (estudando parâmetros comportamentais e fisiológicos de cães transportados por via aérea) verificaram que a sedação induzida pela acepromazina não interfere em nenhum parâmetro fisiológico estudado (frequência cardíaca, contagem de neutrófilos e leucócitos, temperatura corporal ou níveis de cortisol). Estes

autores concluem que a sedação não altera as respostas de estresse. Outros estudos apontam tanto efeito bradicárdico como taquicárdico da acepromazina. Segundo Fantoni e Cortopasi (2002) a acepromazina promove redução dose dependente da pressão arterial, podendo acarretar taquicardia reflexa e aumento da concentração de catecolaminas circulantes. Pode-se verificar, também, diminuição da pressão venosa central, que está relacionada diretamente com o aumento da frequência cardíaca, combinada com a redução da resistência vascular sistêmica, resultando no aumento inicial do débito cardíaco. Outros efeitos apontam que a acepromazina pode provocar bradicardia por bloqueio átrio ventricular e até mesmo bloqueio sinoatrial, em animais pré-dispostos, indicam redução da dose e aplicação via intramuscular .

5.2 Temperatura Corporal e Frequência Respiratória

A temperatura corporal variou significativamente com o fator tempo, sendo a temperatura final maior que a inicial para todos os animais. Esse incremento de temperatura pode ser atribuído a elevação da temperatura ambiental (visto que o término do transporte dá-se no início da tarde (12:00hs) e ao estresse do transporte. Porém não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos, demonstrando que, a fármaco-acupuntura e a acepromazina não interferem na temperatura corporal em equinos submetidos ao estresse de transporte.

Segundo Fantoni e Cortopasi (2002) a administração de acepromazina pode levar a uma possível redução da temperatura corporal, entretanto essa diminuição de temperatura não foi observada no presente estudo.

Nossos resultados apontam um aumento da FR causada pelo estresse nos grupos CTL-SAL, VG1-SAL e VG1-ACP 1/10. No grupo CTL-ACP 1%, a acepromazina promoveu uma inibição do aumento da FR induzida pelo estresse, o que sugere uma possível depressão respiratória provocada pela acepromazina. A depressão cardiorrespiratória é um dos efeitos colaterais dos fenotiazínicos em geral e também da acepromazina em cavalos (FANTONI; CORTOPASI, 2002), e pode ser perigoso em animais com problemas respiratórios e em ambientes pouco ventilados.

Estes resultados corroboram com Luna e colaboradores (2008) que observaram redução da FR induzida pela dose usual de acepromazina enquanto que a fármaco-acupuntura e a aqua-acupuntura no VG1 não provocaram alteração na FR. Assim fármaco-acupuntura com utilização de doses subclínicas de drogas pode ser uma alternativa para evitar os efeitos colaterais indesejáveis de algumas drogas.

5.3 Análise do Comportamento

Partindo da premissa que o ponto focal do experimento constituía-se do transporte, os animais utilizados no experimento foram adaptados às manipulações (de embarque e desembarque, coleta de sangue e saliva), sendo apenas o transporte uma novidade. Essa adaptação somada a uma manipulação cuidadosa propiciou que as operações citadas transcorressem de forma tranqüila no dia do experimento, evitando assim sobressaltos de estresses.

Os animais usados no experimento foram adaptados às manipulações, embarque e desembarque, sendo apenas o transporte uma novidade para os animais. Com a adaptação prévia e a manipulação cuidadosa dos animais, no dia do experimento não observamos animais muito agressivos e todos os procedimentos (coletas, embarque e desembarque) foram executados em todos os animais sem grande variação de tempo. A análise comportamental foi realizada através de um escore de atividade, no qual escore 1 um indicaria sedação e escore 6

agitação. Apenas o grupo CTL-ACP 1%, apresentou sedação considerável, com abaixamento de cabeça e relaxamento peniano. Apesar do grupo VG1-ACP 1/10 não ter apresentado sedação significativa, alguns animais deste grupo apresentaram algum grau de sedação.

Nossos resultados diferem de Luna e colaboradores (2008) que observaram a sedação produzida pela fármaco-acupuntura no VG1. No entanto devemos considerar que a análise do comportamento realizada por Luna e colaboradores se baseou no escore de sedação (soma de parâmetros como ptose palpebral e labial resposta a diferentes estímulos) e no abaixamento de cabeça medido pela distância do focinho do animal ao chão. No presente estudo os animais foram submetidos ao estresse, e o comportamento analisado enquanto os animais estavam no caminhão e depois do desembarque. Desta forma, a análise do comportamento foi mais subjetiva e superficial o que limita bastante a interpretação dos resultados. Considerando que outros estudos mostraram que a acupuntura pode atenuar comportamento aversivo induzido pelo estresse agudo (GUIMARÃES *et al.*, 1997), acreditamos que a análise do comportamento realizada neste estudo não foi eficiente na determinação das variações mais sutis de comportamento que poderiam ser alteradas pela acupuntura.

5.4 Níveis de cortisol durante o estresse

Nossos resultados mostraram que houve um aumento significativo nos níveis de cortisol sérico imediatamente após o estresse e que estes valores voltaram ao basal 30 minutos após o desembarque. O que indica que o transporte foi estressante para os animais e corrobora com diversos estudos anteriores (BAUCUS *et al.*, 1990a; BAUCUS *et al.*, 1990b; CLARK; FRIEND; DELLMEIER, 1993; SMITH *et al.*, 1996; FRIEND, 2000; STULL; RODIEK, 2000; FAZIO; FERLAZZO, 2003; FAZIO *et al.*, 2008).

Por outro lado, a fármaco-acupuntura, a aqua-acupuntura e, surpreendentemente, a acepromazina, não alteraram os níveis de cortisol dos animais transportados. Enquanto que alguns estudos apontam que a acupuntura pode promover uma redução do aumento dos níveis de cortisol induzido pelo estresse (LIAO, 1978), outros estudos não conseguiram mostrar esta redução (GUIMARÃES *et al.*, 1997). Os mesmos dados contraditórios podem ser observados para a ação da acepromazina. Enquanto que Bergeron e colaboradores (2006) verificaram que a acepromazina não interfere no aumento de cortisol induzido pelo estresse de transporte aéreo em cães, López-Olvera e colaboradores (2007) demonstraram que a acepromazina pode diminuir o aumento do cortisol induzido por estresse de captura em *Rupicapra pyrenaica* (caprino das montanhas). Neste contexto devemos considerar o tipo de estresse a que o animal está sendo submetido, o grau de domesticação do animal e a dose de acepromazina utilizada. A captura para animais selvagens representa um estresse muito mais intenso que o transporte em animais domésticos e promove elevações de cortisol muito mais significativas. O que faz com que a sedação seja fundamental na redução dos níveis de cortisol. Em animais domesticados, como as elevações do cortisol induzidas pelo transporte são mais brandas, a ação da acepromazina nesta redução deve ser menor.

A ausência de efeitos da acepromazina na redução das respostas de estresse em animais domésticos transportados deve ser levada em consideração na decisão do uso deste medicamento nestes animais. Apesar do possível efeito benéfico deste medicamento em animais agressivos, principalmente na prevenção de acidentes e lesões, em animais “normais” em que a manipulação adequada já possibilita a um manejo razoavelmente seguro, este medicamento pode ser completamente dispensável e até mesmo maléfico. Devemos lembrar que a sedação pode levar a um maior número de quedas durante o transporte e a depressão respiratória pode evidentemente piorar quadros respiratórios. Além disso, se o medicamento não previne o aumento dos níveis de cortisol, ele não reduz os possíveis efeitos em longo

prazo do aumento repetitivo dos níveis de cortisol no organismo, ou seja, as consequências do estresse para o animal.

No presente estudo foi realizada a coleta de saliva em diversos momentos do transporte para a verificação dos níveis de cortisol salivar. Infelizmente a técnica de radioimunoensaio utilizada não foi eficiente na detecção do cortisol salivar. Schimidt e colaboradores (2010) estudaram os níveis de cortisol salivar durante o transporte rodoviário em equinos e verificaram um aumento significativo deste nível, 30 minutos após o embarque. O estudo do cortisol salivar poderia ser mais uma ferramenta mais sensível na determinação de um possível efeito da acupuntura no estresse em equinos. Além disso, outros protocolos de estimulação por acupuntura (outros pontos, tipo de estimulação e um número maior de sessões) devem ser testados para verificar se o procedimento pode trazer benefícios para estes animais.

As estratégias para reduzir o estresse de animais transportados estão intimamente relacionadas com as condições do transporte que os animais são submetidos (FRIEND, 2001) e com os bons tratos para introduzir os cavalos dentro do caminhão. Sendo assim o uso da força no embarque e o desembarque do caminhão de transporte são fatores adicionais de estresse para o cavalo (SHANAHAN, 2003). Uma importante recomendação neste sentido é de não usar força ou dor física para o animal cooperar. Além do embarque e desembarque tranquilos, devemos levar em consideração: a disposição dos animais (animais soltos ou presos), a quantidade de animais no transporte (se soltos os animais tem maior risco de queda e de não levantarem se tiver muitos cavalos), a distância a ser percorrida, o tipo de reboques de cavalos (sendo melhores os reboques fechados, podendo ser de alumínio, com paredes laterais, cobertura superior e isolantes térmicos, diminuindo assim desidratações, e exposição a calor e frio intensos) (FRIEND, 2001).

6. CONCLUSÕES

1) O transporte rodoviário de 2,5 horas promoveu aumento na Frequência cardíaca (FC Med, FC Max e FC Min), na Frequência respiratória, na temperatura corporal e nos níveis de cortisol sérico em equinos saudáveis.

2) Os maiores valores de FC foram observados no momento do desembarque.

3) A fármaco-acupuntura com 1/10 da dose de acepromazina no ponto de acupuntura VG1 aplicada imediatamente antes do embarque foi capaz diminuir o aumento da FC induzido pelo estresse. No entanto, este tratamento não alterou outros parâmetros estudados como o grau de atividade, Frequência respiratória, temperatura corporal e níveis de cortisol sérico.

4) A aqua-acupuntura (injeção de salina) no ponto VG1 aplicada imediatamente antes do embarque não alterou nenhum dos parâmetros estudados.

5) A acepromazina (0,1mg/Kg, IM) aplicada imediatamente antes do embarque produziu sedação considerável e bloqueou o aumento da Frequência respiratória induzida pelo estresse. No entanto, a acepromazina não preveniu o aumento dos níveis de cortisol e da frequência cardíaca média induzida pelo estresse. Estes resultados sugerem que este medicamento não preveniu o aumento dos níveis de estresse induzido pelo transporte em equinos.

6) Estratégias de manejo para reduzir o estresse e dar mais conforto aos cavalos transportados podem ser mais eficientes que o uso de drogas. Estas estratégias como: evitar as agressões, dar água durante o transporte longo, usar transporte fechados para evitar incidências de fatores climáticos diretamente nos animais, devem ser adotadas para que o transporte seja menos estressante possível e seguro para os animais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, H. R. **Farmacologia e Terapêutica Veterinária**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2003.p. 258 -259.
- AKANA, S. F.; DALLMAN, M. F.; BRADBURY, M. J.; SCRIBNER, K. A.; STRACK, A. M.; WALKER, C. D. Feedback and facilitation in the adrenocortical system: unmasking facilitation by partial inhibition of the glucocorticoid response to prior stress. **Endocrinology**, v.131, p.57-68, 1992.
- 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 Research**, v.1073/1074, p.305–310. 2006.
- BAUCUS, K. L.; RALSTON, S. L.; NOCKELS, C. F.; MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Effects of transportation on early embryonic death in mares. **Journal of Animal Science**, v.68, p.345-351. 1990.a.
- BAUCUS, K. L.; SQUIRES, E. L.; RALSTON, S. L.; MCKINNON, A. O.; NETT, M. T. Effects of transportation on the estrous cycle and concentrations of hormones in mares. **Journal of Animal Science**, v.68, p.419-426. 1990b.
- BEAUNOYER, D. E.; CHAPMAN, J. D. Trailering stress on subsequent submaximal exercise performance. In: **Proc. 10th Equine Nurt. Physiol. Symp.**, Fort Collins, CO. p.379-384. 1987.
- BERGERON, R.; SCOTT, S. L.; ÉMOND, J. P.; MERCIER, F.; COOK, N. J., SCHAEFER, A. L. Physiology and behavior of dogs during air transport. **The Canadian Journal of Veterinary Research**; v.66, p.211-216. 2002.
- BRASIL, 2008. Instrução Normativa nº 56 de 2008 - Recomendações de Boas Práticas de Bem-estar para Animais de Produção e de Interesse Econômico.2008 **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 6 de nov. de 2008.
- CAHIR, M.; KING, D. J. Antipsychotics lack alpha 1A/B adrenoceptor subtype selectivity in the rat. **European Neuropsychopharmacology**, v.15, n.2, p.231-234. 2005.~
- CHANG, Y. H.; HISEH, M. T.; WU, C. R. Effect of acupuncture at bai-hui on the deficit of memory storage in rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, v.27, p.289-298,1999.
- CHOU, C. C.; CHEN, C. L.; RICE, B. L.; COLAHAN P. T. Reduced resident time and pharmacodynamic effects of Acepromazine after subclinical multiple dosage in exercised thoroughbreds. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutic**, v.25, n.5, p.379–382. 2002.
- CHROUSOS, G. P.; LORIAUX, D. L.; GOLD, P. W. Mechanisms of physical and emotional stress. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.245, p.3-11, 1988.

CLARK, D. K.; FRIEND, T. H.; DELLMEIER, G. The effect of orientation during trailer transport on heart rate, cortisol and balance in horses. **Applied Animal Behaviour Science**, v.38, p.179-189. 1993.

CODAZZA, D.; MAFFEO, G.; REDAELLI, G. Serum enzyme changes and haematochemical levels in thoroughbreds after transport and exercise. **Journal of the South African Veterinary Association**, v.45, p.331-334. 1974.

COSI, C.; KOEK, W. Agonist, antagonist, and inverse agonist properties of antipsychotics at human recombinant 5-HT receptors expressed in HeLa cells. **European Journal of Pharmacology**, v.433, n.1, p.55-62. 2001.

CREGIER, S. E. Reducing equine hauling stress: a review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.2, p.186-198, 1982.

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

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

FANTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: ROCA, 2002 p389.

FAZIO, E.; FERLAZZO, A. Evaluation of stress during transport. **Veterinary Research Communications**, v.27, (Suppl. I), p.519-524, 2003.

FAZIO, E.; MEDICA, P.; ARONICA, V.; GRASSO, L.; FERLAZZO, A. Circulating β -endorphin, ACTH and cortisol levels of stallions before and after short road transport: stress effect of different distances. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 50, p. 6-12, 2008.

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

FRIEND, T. H. A review of recent research on the transportation of horses. **Journal of Animal Science**, v.79, p.32-40, 2001.

FRIEND, T. H. Dehydration, stress and water consumption of horses during long distance commercial transport. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2568-2580, 2000.

FRIEND, T. H.; MARTIN, T. M.; HOUSEHOLDER, D. D.; BUSHONG, D. M. Stress responses of horses during a long period of transport in a commercial truck. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.212, p.838-844, 1998.

GUIMARÃES, C. M.; PINGE, M. C. M.; YAMAMURA, Y.; MELLO, L. E. A. M. Effects of acupuncture on behavioral, cardiovascular and hormonal responses in restraint-stressed Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.1445-1450.

1997.

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

HAINSWORTH R. The control and physiological importance of heart rate. In: Malik M, Camm AJ, editors. Heart rate variability. Armonk, N.Y.: **Futura Publ. Comp., Inc.**; 1995. p. 3–19.

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

HOLISTICVETPETCARE. Disponível em:
<<http://holisticvetpetcare.com/images2/horse3.gif>>. Acessado em 28 de jul. 2011

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

JANG, M. H.; SHIN, M. C.; LEE, T. H.; LIM, B. V.; SHIN, M. S.; MIN B-I; KIM, H.; CHO, S.; KIM, E. H.; KIM, C. J. Acupuncture suppresses ischemia-induced increase in c-Fos expression and apoptosis in the hippocampal CA1 region gerbils. **Neuroscience Letters**, v.347, n.1, p.5-8. 2003.

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

JIN, J. J.; XU, Y. L.; ZHENG, Y. Effects of acupoint-injection of Kaixilai on TG, TC, MDA, SOD, AST and ALT in the patient of non-alcoholic fatty liver (Chinese). **Zhongguo Zhen Jiu**, v.26, n.2, p.100–102. 2006.

KANBA, S.; SUZUKI, E.; NOMURA, S.; NAKAKI, T.; YAGI, G.; ASAI, M.; RICHELSON, E. Affinity of neuroleptics for D1 receptor of human brain striatum. **Journal of Psychiatry & Neuroscience**, v.19, n.4, p.265-269. 1994.

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. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, n.3, p.349-355. 2003.

KING, J. M.. Shipping fever in horses. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.87,p185. 1992.

LEE, J. D.; PARK, H. J.; CHAE, Y.; LIM, S. An overview of bee venom acupuncture in the treatment of arthritis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v2, n.1, p. 79–84. 2005.

LI P.; ROWSHAN, K.; CRISOSTOMO, M.; TJEN-A-LOOI, S. C.; LONGHURST, J. C. Effect of electroacupuncture on pressor reflex during gastric distension. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.283, p.1335-1345, 2002.

LIAO, S.J. Recent Advances in the understanding of acupuncture. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v51, n.1, p.55-65. 1978.

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

LÓPEZ-OLVERA, J. R.; MARCO, I.; MONTANÉ, J.; LAVÍN, S. Effects of acepromazine on the stress response in Southern chamois, **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.71, p.41–51. 2007.

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

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

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

MCGEE, W. R.. A practical program to reduce the incidence of embryonic and perinatal mortality. In: **Proc. 15th Annu. Convention Am. Assoc. Equine Pract., Houston, TX**. pp 141–150.1969

MERL, S.; SCHERZER, S.; PALME, R.; MÖSTL, E. Pain causes increased concentrations of glucocorticoid metabolites in horse faeces. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.20, n. 9, p.586–590. 2000.

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

MIKSA, I. R.; CUMMINGS, M. R.; POPPENG, R.H. Determination of acepromazine, ketamine, medetomidine, and xylazine in serum: multi-residue screening by liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Analytical Toxicology**, v.29, p.544–551. 2005.

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

OHMURA, H.; HIRAGA, A.; AIDA, H.. Changes in heart rate and heart rate variability in Thoroughbreds during prolonged road transport. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, p.455–462. 2006.

OWEN, R. R.; FULLERTON, J.; BARNUM, D. A.; Effects of transportation, surgery, and antibiotic therapy in ponies infected with Salmonella. **American Journal of Veterinary Research**, v.44, n.1, p.46-50. 1983.

PALME, R.; MÖSTL, E. Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. **International Journal Mammalian Biology**, v.62 (Suppl. II), p.192-197. 1997.

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.

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

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

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. **Journal of Veterinary Medicine**, v.51, n.5, p.218-225, 2004.

SAPOLSKY, R. M. **Stress, the aging brain, and the mechanisms of neuron death**. Cambridge, Massachusetts, 1992. 427p.

SCHATZMANN, U. Practical analgesic treatment in horses. In: Hellebrekers, L. J. (eds), **Animal Pain**, Van der Wees, Utrecht NL, 2000, p.161-179.

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. **Proceedings, 5th Intern. Symposium Equitation Science**, Sydney, jul. 2009, p.53. 2009.

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.

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

SEEMAN, P. Atypical antipsychotics: mechanism of action. **Canadian Journal of Psychiatry**, v.47, n.1, p.27-38. 2002.

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

SHANAHAN, S. Trailer Loading Stress in Horses: Behavioral and Physiological Effects of Nonaversive Training (TTEAM). **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v.6, n.4, p.263-274. 2003.

SMITH, B. L.; JONES, J. H.; CARLSON, G. P.; PASCOE, J. R. Effect of body direction on heart rate in trailered horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.55, p.1007-1011. 1994.

SMITH, B. L.; JONES, J. H.; HORNOF, W. J.; MILES, J. A.; KIM, E. L.; WILLITS, N. H. Effects of road transport on indices of stress in horses. **Equine Veterinary Journal**, v.28, p.446-454. 1996.

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

STULL, C. L.; RODIEK, A. V. Physiological responses of horses to 24 hours of transportation using a commercial van during summer conditions. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1458-1466. 2000.

TEIXEIRA, P. P.; 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, jan./jun. 2002.

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

ULRICH-LAI, Y. M.; FIGUEIREDO, H. F.; OSTRANDER, M. M.; CHOI, D. C.; ENGELAND, W. C.; HERMAN, J. P. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**. v.291, p.965-973. 2006

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

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

WARAN, N. K. Effects of transporting horses facing either forwards or backwards on their behaviour and heart rate. **Veterinary Record**, v.139, p.7-11. 1996.

WARAN, N. K. The behaviour of horses during and after transport by road. **Equine Veterinary Education**, v.5, p.129-132. 1993.

WARAN, N. K.; CUDDEFORD, D. Effects of loading and transport on the heart rate and behaviour of horses. **Applied Animal Behaviour Science**, v.43, p.71-81. 1995.

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

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

2005.

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

YANG, C-H.; LEE, B.; JUNG, H.; SHIM, I.; ROH, P.; GOLDEN, G. Effect of acupuncture on response to immobilization stress. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 72, p.847-855. 2002.

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

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 avaliação individual dos animais durante o transporte

Estresse no transporte Equino DATA: _____

Experimento: _____

GRUPO: _____	
Animal nº _____	Preenchido por: _____
Horário do Início: _____	
Colocação de fita cardíaca nº: _____	Horário de Ativação: _____
Comportamento na Argola: _____	
Temperatura: _____	Frequência Respiratória: _____
Coleta de sangue B1: _____	Coleta de Saliva S1: _____
Fármaco utilizado e via de aplicação: _____	
Comportamento durante medicação: _____	
Embarque Horas: _____	Comportamento: _____
Início do Transporte Horas: _____	Comportamento: _____
Após 30 minutos S2 coleta Horas: _____	Comportamento: _____
Após 60 minutos S3 coleta Horas: _____	Comportamento: _____
Após 90 minutos S4 coleta Horas: _____	Comportamento: _____
Eventos e Horário durante o transporte: _____	Comportamento: _____
Desembarque: _____	Comportamento: _____
Coleta de sangue B2: _____	Coleta de Saliva S5: _____
Esperar 30 minutos após embarque: _____	Comportamento: _____
Temperatura: _____	Frequência Respiratória: _____
Coleta de sangue B3: _____	Coleta de Saliva S6: _____
Comportamento: _____	
Retirada da fita cardíaca: _____	

Observações: _____