



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA



**ESTUDO DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM EQUINOS
DURANTE O CASQUEAMENTO COM A UTILIZAÇÃO DE FEROMÔNIO
MATERNO EQUINO**

RENATA ALVES DE PAULA

Botucatu-SP

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA



**ESTUDO DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM EQUINOS
DURANTE O CASQUEAMENTO COM A UTILIZAÇÃO DE FEROMÔNIO
MATERNO EQUINO**

RENATA ALVES DE PAULA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Simone Biagio Chiacchio

Botucatu-SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Paula, Renata Alves de.

Estudo da variabilidade da frequência cardíaca em equinos durante o casqueamento com a utilização de feromônio materno equino / Renata Alves de Paula. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Simone Biagio Chiacchio

Capes: 50501062

1. Animais - Proteção. 2. Equino - Comportamento. 3. Feromônios. 4. Variabilidade do batimento cardíaco. 5. Eletrocardiografia ambulatorial.

Palavras-chave: Bem-estar animal; Comportamento; Feromonioterapia; Holter; VFC.

Nome do Autor: Renata Alves de Paula

Título: ESTUDO DA VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM EQUINOS DURANTE O CASQUEAMENTO COM A UTILIZAÇÃO DE FEROMÔNIO MATERNO EQUINO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Ass. Dr. Simone Biagio Chiacchio

Presidente e Orientador

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP – Botucatu, SP

Profa. Ass. Dra. Maria Lucia Gomes Lourenço

Membro Titular

Departamento de Clínica Veterinária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP – Botucatu, SP

Profa. Dra. Leticia Peternelli da Silva

Membro Titular

Departamento de Clínica Veterinária

Universidade de Marília – UNIMAR – Marília/SP

Data da Defesa: 06 de junho de 2018.

Dedicatória:

*Dedico essa dissertação aos meus pais **Rosangela e Renato**, que me apoiaram financeiramente e emocionalmente durante todos esses anos de caminhada profissional.*

Aos meus orientadores por todo o incentivo, compreensão, paciência e oportunidade em realizar este sonho.

*“Simpatia para ser feliz: 1- Pegue um cavalo; 2- Escove o cavalo; 3- Coloque a sela;
4- Monte no cavalo; 5- Saia para um passeio. ”*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a **DEUS**, que me deu o dom da vida e a oportunidade de lutar a cada dia para conquistar os objetivos almejados. Sem ele nada seria possível, só tenho motivos para agradecer: “Obrigada **DEUS**” por estar comigo até mesmo quando eu menos mereci, por conceder inúmeras graças, por me perdoar e principalmente por não desistir de mim”.

Agradeço **aos meus pais** pois sem eles nada seria possível, por todo incentivo emocional e financeiro durante esta caminhada profissional. Ao meu irmão “**Guiga**” e aos **demais familiares** por todas as palavras de carinho e que me deram força.

Ao meu orientador **Simone** pela oportunidade em participar deste programa de pós-graduação e realizar um sonho.

A minha também orientadora **Malu** por todo aprendizado, paciência, dedicação e também pelas críticas construtivas as quais fizeram parte do meu desenvolvimento pessoal e profissional e que levarei por toda a vida, muito obrigada por tudo!

A minha “uma vez” e “sempre” orientadora **Leticia** que me ensinou muito desde o meu estágio curricular até o presente momento e é totalmente responsável por esta conquista além de se tornar uma amiga pessoal e parceira que admiro muito e sou eternamente grata.

Agradeço imensamente a minha amiga **Amanda** que me ajudou por todo este período e sempre esteve comigo nos momentos em que mais precisei, “não tenho nem palavras para expressar o quanto sou grata a você”!

A minha amiga e companheira de trabalho **Marina**, que me deu forças para sempre continuar e esteve comigo durante as coletas e durante os momentos mais difíceis deste trabalho. E também por autorizar seu funcionário e meu amigo **Gaúcho** a deixar as suas obrigações para me ajudar neste experimento, sou eternamente grata.

Agradeço a minha amiga **Raissa**, que me ajudou no início desta empreitada e mesmo a distância se empenhou para me ajudar na conclusão deste projeto.

Ao **Raphael**, colega que também ajudou nas práticas e foi muito prestativo na escolha do local para realização da pesquisa. Aos **proprietários e funcionários** do

Haras Josilmar, Fazenda Santa Fé e Santanna's Ranch, que nos cederam o espaço, funcionários e o tempo de realização deste experimento. Sem vocês isso não teria ocorrido.

*À todos da **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP**, Campus de Botucatu-SP, que diretamente e indiretamente contribuíram para este trabalho.*

*À **Pós-graduação** em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP, Campus de Botucatu-SP.*

*E finalmente, mas não menos importante a **todos os animais** que participaram deste trabalho, pois sem vocês ele não existiria.*

Lista de Tabelas

	Página
Tabela 1. Mean (standard deviation) and p values for HR, RR, and Blood sugar level measurements obtained through clinical examination of equines undergoing hoof trimming with previous treatment with EMP and placebo.	51
Tabela 2. Mean (standard deviation) and p values for Minimum HR, Average HR and Maximum HR obtained through Holter examination of equines undergoing hoof trimming with previous treatment with EMP and placebo.	51
Tabela 3. Heart rate variability indexes (mean \pm standard deviation) obtained through Holter examination in the EMP and Placebo groups before (M1), during (M2) and after (M3) hoof trimming.	52

Lista de Quadros

	Página
Quadro 1. Chart 1. Time-domain HRV indexes.....	47

Lista de Figuras

		Página
Figura 1.	Órgão vomeronasal de mamíferos.....	25
Figura 2.	Modelo biológico de resposta animal ao estresse (Fonte: Moberg, 2000)	27
Figura 3.	Identified syringes (A e B), the product being prepared and application by the examiner in the outer edges of the animal's nostril.....	47
Figura 4.	Holter Equipment – Cables, electrodes, SD Card and protective cover.....	48
Figura 5.	Position of the electrodes in the animal left (E) and right (D) sides; Holter device attached to the animal's neck.....	48
Figura 6.	Equipment used in the hoof trimming procedure (pincer, rasp and hoof knife) and trimming being conducted.....	48
Figura 7.	Sequence established for the hoof trimming procedure: (1) Right thoracic limb (MTD); (2) Right pelvic limb (MPD); (3) Left thoracic limb (MTE); (4) Left pelvic limb (MPE).....	49
Figura 8.	Overview of the experiment sequence for the study.....	49
Figura 9.	Behavior of the HR in Placebo and EMP groups before (M1) and after (M2) the hoof trimming procedure.....	49
Figura 10.	Quantification of the behavioral reactions given by the animals in the Placebo group as registered by Observer 1 (Obs1) and Observer 2 (Obs2).....	50
Figura 11.	Quantification of the behavioral reactions given by the animals in the EMP group as registered by Observer 1 (Obs1) and Observer 2 (Obs2).....	50

LISTA DE ABREVIACOES

BEA: Bem-estar animal

FME: Feromônio materno equino

FC: Frequência Cardíaca

HF: *High Frequency*

Hz: Hertz

LF: *Low Frequency*

ms: Milissegundos

MTD: Membro torico direito

MTE: Membro torico esquerdo

MPD: Membro pélvico direito

MPE: Membro pélvico esquerdo

mV: Milivolts

NN ou RR Médio: Intervalo entre duas ondas R consecutivas, ou NN médio de todo o registro

PNN>50: Percentagem de intervalos RR ou NN adjacentes com diferença de durao superior a 50 milissegundos

RMSSD: Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR ou NN normais adjacentes

NSA: Nodo Sinoatrial

SDANN: Desvio-padrão da média dos intervalos RR ou NN normais a cada cinco minutos

SDNN: Desvio-padrão da média de todos os intervalos RR ou NN normais

SDNNi: Média dos desvios padrão dos intervalos RR ou NN normais a cada cinco minutos

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso Parassimpático

SNS: Sistema Nervoso Simpático

VFC: Variabilidade da Frequência Cardíaca

VN: Vomeronasal

SUMÁRIO

RESUMO	12	
ABSTRACT	14	
CAPÍTULO I	REVISÃO DE LITERATURA	16
1. INTRODUÇÃO	17	
2. REVISÃO DE LITERATURA	18	
2.1 ETOLOGIA EQUINA	18	
2.2 FEROMÔNIOS.....	21	
2.3 MECANISMO DE DETECÇÃO DOS FEROMÔNIOS.....	23	
2.4 O SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO E A VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA COMO INDICADOR DE ESTRESSE	26	
3. OBJETIVOS GERAIS	31	
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31	
CAPÍTULO II	ARTIGO CIENTÍFICO	32
DISCUSSÃO GERAL	54	
CONCLUSÃO GERAL	57	
NORMAS DA REVISTA	58	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59	

PAULA, R.A. **Estudo da variabilidade da frequência cardíaca em equinos durante o casqueamento com a utilização de feromônio materno equino.** Botucatu. 2018. 66p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

RESUMO

A equinocultura encontra-se em constante crescimento e por isso há um maior interesse em estudos científicos que favoreçam a relação homem animal garantindo consequentemente o bem-estar animal. Discussões são cada vez mais frequentes, envolvendo não só as formas de criação como também as práticas as quais são submetidos. A feromonioterapia é uma nova alternativa que vem sendo estudada a fim de tranquilizar e reduzir os problemas relacionados ao medo, ansiedade e fobia e limitando as manifestações do sistema nervoso autônomo e consequentemente o estresse a esses animais. Para tanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a variabilidade da frequência cardíaca (VFC) de equinos submetidos ao tratamento com Feromônio Materno Equino (FME) durante o procedimento de casqueamento. Foram avaliados 20 potros, com idade média de vinte e quatro meses, machos e fêmeas sem experiência prévia ao casqueamento que foram divididos em dois grupos (A e B) onde um deles recebeu tratamento com FME e o outro placebo (excipiente sem o princípio ativo), considerado randomizado e duplo-cego. Os parâmetros avaliados foram frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (FR), glicemia, VFC e análise de reações comportamentais. O exame clínico foi avaliado em dois momentos sendo: M1 (20 minutos previamente ao casqueamento) e M2 (20 minutos após o casqueamento). Já a VFC, foi avaliada nos momentos pré, trans e pós casqueamento. Os resultados demonstraram que não houve diferenças estatísticas dos parâmetros clínicos avaliados (FC, FR e glicemia) em comparação com os grupos (FME e placebo) em relação aos momentos M1 e M2. A FC mínima, FC média e FC máxima e principalmente os índices da VFC (SDNN, SDANN e SDNNi, RMSSD e PNN50) também não diferiram quando se comparou os grupos nos momentos pré, trans e pós casqueamento. Embora não tenha ocorrido significância, observou-se tendência a

diminuição dos parâmetros FC, glicemia e reatividade em um dos grupos, havendo percepção nítida de mudança no comportamento durante o casqueamento sugerindo maior tranquilidade dos equinos durante o procedimento, com a feromonioterapia.

Palavras-chave: Bem-estar animal, VFC, Comportamento, Feromonioterapia, Holter

PAULA, R.A. **Study of the heart rate variability in equines during hoof conformation procedure with the use of maternal equine pheromone.** Botucatu. 2018. 66p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP).

ABSTRACT

The horse breeding is found in constant growth and then there is a greater interest in scientific studies that favor the animal man relationship therefore ensuring animal welfare. Discussions are increasingly frequent, involving not only the forms of creation but also the practices which are submitted. Pheromone therapy is a new alternative that has been studied in order to reassure and reduce the problems related to fear, anxiety and phobia and limiting the manifestations of the autonomic nervous system and consequently the stress to these animals. For this purpose, the aim of this study was to evaluate the heart rate variability (HRV) of horses submitted to treatment with Maternal Equine Pheromone (MEP) during the hoof trimming. We evaluated 20 foals, with an average age of twenty-four months, males and females without prior experience to the hoof trimming that were divided into two groups (A and B) where one received treatment with MEP and the other placebo (excipient without the active ingredient), considered randomized and double-blind. The parameters evaluated were heart rate (HR), respiratory rate (FR), blood glucose, HRV and analysis of behavioral reactions. The clinical examination was studied in two moments: M1 (20 minutes before the procedure hoof trimming) and M2 (20 minutes after the procedure hoof trimming). Already the HRV was evaluated in pre, trans and post procedure hoof trimming. The results showed that there was no statistical differences of clinical parameters evaluated (FC, FR and glucose) compared to the groups (MEP and placebo) in relation to the moments M1 and M2. Minimum FC, medium FC and maximum FC and especially the index of VFC (SDNN, SDANN e SDNNi, RMSSD e PNN50) also did not differ when compared the groups in moments pre, during and after procedure hoof trimming. Although there has not been significance there was a tendency to decrease the parameters FC, blood glucose and reactivity in one of the groups, there being clear perception of change in behavior during procedure hoof

trimming with pheromone therapy suggesting greater tranquility of equines during the procedure.

Keywords: Animal welfare, Behavior, HRF, Pheromone therapy, Holter

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

Pesquisas recentes demonstraram que a equinocultura brasileira está em ascensão e que nos últimos 10 anos da atividade ocorreu um aumento de aproximadamente 12% no seu faturamento bruto anual. De acordo com IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia Estatística (2016) o Brasil possui uma população de aproximadamente 5 milhões de equinos onde 1,1 milhões são animais destinados a esporte, lazer e criação e o restante 3,9 milhões, realizam atividades de trabalho no campo.

A preocupação com o bem-estar animal (BEA) no Brasil vem se destacando cada vez mais, pois vários setores da sociedade têm se organizado no sentido de reivindicar melhorias nas condições das criações de animais. Discussões tem sido realizadas com enfoque nas atividades equestres, o que torna de extrema importância estudos utilizando métodos científicos que comprovem em quais situações os animais sofrem alterações na qualidade de vida e no bem-estar e, conseqüentemente, determinar métodos que auxiliem positivamente nos sistemas de criação (GONTIJO et al., 2014).

Como o homem interviu na biologia e natureza dos equinos alguns procedimentos foram introduzidos no manejo destes animais, como por exemplo o cuidado intensivo no casco. O casqueamento deve ser realizado principalmente nos cavalos estabulados, pois estes necessitam de cuidados diários de manutenção, higiene e equilíbrio. O contorno dos cascos dos membros torácicos deve sempre obedecer a forma arredondada e, dos membros pélvicos ligeiramente ovalados, sempre mantendo a concavidade da sola, barras sólidas, ranilha nitidamente acima do solo quando o membro repousa sobre superfície lisa, também deve-se manter uma inclinação de pinça paralela ao eixo da quartela (SAMPAIO; SILVA, 2013).

Estas situações quando inéditas podem se tornar estressantes se realizadas de forma negativa ao animal, pois o mesmo será obrigado a realizar adaptação e alterações fisiológicas para sua sobrevivência (MENGOLI, 2014). Quando realizado de forma traumática pode predispor ao desenvolvimento de comportamentos não desejados, comprometendo assim o BEA, uma vez que, dentre os mamíferos domésticos, o cavalo é significativamente evoluído em termos cognitivos (HELESKI et al., 2002)

O estresse pode elevar a frequência cardíaca (FC) em decorrência da ativação do sistema nervoso simpático (SNS) e liberação de catecolaminas (SCHMIDT et al., 2010). A descoberta da relação entre o sistema nervoso autônomo (SNA) possibilitou a elaboração de estudos vinculados ao aumento da atividade simpática e redução da atividade parassimpática sendo a variabilidade da frequência cardíaca (VFC), o marcador mais promissor da atividade do SNA (LOPES et al., 2013). No entanto, a avaliação de uma resposta ao estresse é melhor realizada quando se compara comportamentos e medidas fisiológicas (BROOM, 1991; MASON E MENDL, 1993).

Substâncias neurolépticas, sedativas e tranquilizantes, podem ser utilizadas a fim de melhorar e facilitar o manejo em algumas práticas, porém, podem causar efeitos colaterais, como por exemplo, alterações hematológicas e bioquímicas que acabam por repercutir na homeostase orgânica (COOPER, 1998; FALEWEE et al., 2006).

Uma alternativa promissora para os problemas relacionados ao medo, ansiedade e fobia é a feromonioterapia, comprovada cientificamente com estudos realizados nas espécies canina, felina, suína e leporina (GAULTIER et al., 2005). Em equinos a sua eficácia foi estudada em casos isolados, porém é uma ferramenta que pode otimizar o manejo, bem como facilitar a relação homem-animal promovendo a prática do BEA (FALEWEE et al., 2006; COZZI et al., 2011).

Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a VFC em potros submetidos ao manejo de casqueamento sob efeito do tratamento com feromônio materno equino (FME), visando-se o emprego do mesmo a fim de propiciar o bem-estar destes animais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETOLOGIA EQUINA

A etologia é definida como a ciência que estuda o comportamento animal a partir de observação e descrição detalhada, com o principal intuito de entender o funcionamento de mecanismos fisiológicos (BROOM & FRASER 2010). Este estudo pode ser abordado de duas formas: fisiológica e psicológica. A primeira está relacionada a mecanismos do sistema nervoso e sua relação com o comportamento

animal e a segunda, aos fatores ambientais e históricos que podem interferir no comportamento animal. Ambas estão intimamente ligadas ao BEA (CINTRA, 2014).

Desde a sua domesticação, que ocorreu entre 5.000 e 6.000 anos, os cavalos enfrentaram grandes mudanças realizadas pelo homem, que passou a controlar sua alimentação, habitat e forma de socialização destes animais, artificialmente (CINTRA, 2011).

Na natureza, os equinos eram livres e independentes para migrarem juntamente com a sua tropa para diferentes locais (nômades), fugindo de predadores onde o principal objetivo era encontrar um ambiente seguro mesmo que este não tivesse conforto e alimentação suficiente para todos (BIRD, 2004; CINTRA, 2014). Além da busca pela segurança, a socialização era outro fator relevante nestes grupos, que geralmente eram formados por até 20 animais, dentre estes, garanhões, éguas e potros que estabeleciam uma hierarquia e uma interação social intensa (BIRD, 2004).

Com a intervenção do homem, os equinos passaram a ser confinados em locais reduzidos com capacidade de locomoção restrita por até 24 horas. Raramente possuem contato com outros animais de mesma espécie tornando improvável a interação social (FUREIX et al. 2009). De acordo com Goodwin (1999), a sobrevivência e o sucesso da reprodução de um animal dependem exclusivamente do seu comportamento e de sua interação com o ambiente.

Em relação ao comportamento alimentar, os cavalos possuem um sistema digestório adaptado para receber pequenas quantidades de alimento por longos períodos do dia e da noite e quando no seu ambiente natural, permanecem cerca de 60 a 70% do dia pastejando. Entretanto quando estabulados passam a receber grandes quantidades de alimentos em um tempo reduzido (20% do dia) e, sofrem modificação na qualidade e composição da dieta (BIRD, 2004; CINTRA, 2014).

Todas estas modificações dependem de ajustes anormais ou extremos na fisiologia e no comportamento do animal e estas novas adaptações são consideradas como uma situação de estresse que afeta diretamente o BEA (CASEY, 2002; THORNE et al., 2005; VISSER et al., 2008).

O termo BEA é interpretado erroneamente quando se admite que o termo em si significa apenas que o animal está sendo bem alimentado, com excesso de cuidados e confinados em baias. A ciência que estuda bem-estar fundamenta-se não apenas na integridade física, mas também na saúde mental dos animais que se

correlaciona totalmente ao respeito com a sua natureza (BROOM, 2004). De acordo com Smythe (1990) o cérebro do cavalo foi especialmente adequado para os requisitos de um animal que vive pastando e conseqüentemente atento a predadores.

Nos últimos anos, houve um aumento do número de provas científicas que sustentam a ideia de que a capacidade cognitiva dos animais é muito maior do que se pensava antigamente, e assim comprovou-se que os animais têm sentimentos bons e ruins, e por isso são considerados seres sencientes (DUNCAN E PATHERICK, 1991).

A senciência é a capacidade que um ser tem de sentir conscientemente algo, ou seja capaz de vivenciar experiências positivas e negativas. Isso ressalta a importância em atentar-se para os sentimentos de medo, ansiedade, frustração e sofrimento à que esses animais são submetidos (DUNCAN, PATHERICK, 1991; MOLENTO, 2006). Estas sensações nem sempre são facilmente identificadas pois apresentam uma subjetividade na interpretação de suas variáveis (PROCTOR, 2012).

Blake (1977) descreveu o cavalo como uma das espécies mais sensíveis para identificar e modular os estímulos do meio ambiente, sendo assim, estes muitas vezes interpretam comandos realizados pelo homem como uma ameaça e mesmo quando habituados podem manifestar uma reação de medo ou comportamento relacionado a luta, fuga ou inerte (MENGOLI, 2014).

Devido a característica natural dos cavalos em conviver em grupos hierárquicos, os mesmos podem ser facilmente dominados pelo homem, que deve ater-se a estratégias de trabalho que permitam uma relação forte e positiva entre ambos, principalmente quando se trata de animais jovens que ainda estão em processo de formação (SMYTHIE, 1990; CINTRA, 2014).

Kiley-worthington (2011), diz que emoções prazerosas, consideradas positivas e não prazerosas, consideradas negativas são necessárias para o aprendizado do animal. Sendo assim, compreender como os animais interpretam as emoções nas práticas a que são submetidos é fundamental para melhorar o seu bem-estar e a sua qualidade de vida (PROCTOR, 2012).

Waring (2003), afirma que os cavalos possuem uma memória considerada longa e além disso uma dificuldade em modificar um comportamento aprendido por algo novo. Por isso, é de extrema importância que o primeiro contato de um animal com uma experiência nova seja positivo, pois esta resposta é que irá permanecer

quando estiverem diante de uma experiência similar no futuro (CINTRA, 2014; MENGOLI, 2014).

2.2 FEROMÔNIOS

Além do estudo do comportamento outras ferramentas vêm sendo avaliadas a fim de auxiliarem a relação homem *versus* animal como por exemplo o uso do feromônio. Essa substância vem sendo pesquisada a fim de otimizar a prevenção de alterações comportamentais relacionadas ao estresse, ao comportamento em si e ao contato social por modular eventos relacionados a cópula, agressão, ligação de mãe-filho, reconhecimento familiar, apaziguamento e sincronização de estro (BERGER et al., 2013).

O termo feromônio, criado por Peter Karlson e Martin Lüscher em 1959, surgiu a partir das palavras gregas *pherein* (transportar) e *hormone* (estimular) e foi definido como “substâncias secretadas para fora de um indivíduo e recebidas por um segundo indivíduo da mesma espécie, no qual liberam uma reação específica, por exemplo, um comportamento determinado ou processo de desenvolvimento”. Também são denominados como semioquímicos ou ectormônios (DALACQUA; BARROS, 2006), sendo considerados compostos orgânicos, geralmente voláteis e hidrofóbicos, que podem ser hidrocarbonetos ou incluírem grupos funcionais como álcoois, aldeídos, cetonas (BRENHAS, SILVA, 2008).

A comunicação entre os animais pode ocorrer por sinais visuais, sonoros ou químicos que desencadeiam uma ponte de comunicação entre indivíduos. Os feromônios são considerados substâncias de ação interespecíficas quando são acionados em seres da mesma espécie, ou são considerados intraespecíficos quando têm ação na fisiologia ou no comportamento de animais de espécies distintas (VILELA et al., 1987).

Ressalta-se a importância entre a distinção dos termos hormônios e feromônios onde diferenciam-se principalmente pelo meio em que são liberados, sendo o primeiro substâncias produzidas internamente, influenciando o metabolismo do animal e o segundo emitido para o meio externo, promovendo uma interação entre indivíduos da mesma espécie (BRENHAS, SILVA, 2008).

Os semioquímicos são produzidos em locais diferentes do organismo, de acordo com cada espécie e quando liberados no ambiente são interpretados por indivíduo da mesma espécie como forma de sinalizar aceitação de acasalamento, fortalecimento de laços entre mãe e prole, além de auxiliar na socialização dos animais (VAGLIO, 2009). Nos mamíferos, os estímulos feromonais podem ser derivados da urina, fezes e/ou glândulas cutâneas (ARANDA, 2011).

Em humanos são encontrados na pele sendo secretados por glândulas sudoríparas, onde ocorre a síntese, armazenamento e posterior liberação nos queratinócitos sobre forma de metabólitos (COWLEY, 1991; BERLINER, 1991; COHN, 1994). De acordo com Vaglio (2009), no momento do nascimento e durante as primeiras semanas de vida ocorre a produção e liberação do feromônio materno na região para-axilar, que é responsável pelo direcionamento e reconhecimento do mamilo pelo bebê.

Em coelhas, imediatamente após o parto, há liberação de um feromônio mamário, *2-metil-but-2-enal (2MB2)*, para promover a sucção em seus filhotes. Schaal et al., (2003), realizou experimento onde uma vareta de vidro foi embebida em 2MB2 e apresentada a coelhos recém-nascidos que imediatamente demonstraram comportamentos de busca e apreensão (LOGAN, 2015).

Em suínos, Wells (2009) relata os benefícios da utilização de feromônios, tais como redução de comportamento agressivo durante reagrupamento de animais usando cheiro de feromônios sexuais e diminuição de brigas e melhor ganho de peso no agrupamento de leitões pós desmame com uso de feromônios maternos. Krebs (2007) verificou que leitões desmamados expostos a aroma de banana e feromônio materno passaram mais tempo em repouso, e, ainda, os tratamentos exerceram um efeito positivo sobre o sistema imune. Por outro lado, não diminuiu a concentração de cortisol, hormônio indicador de estresse (MAIA et al., 2013).

Na espécie felina há produção e deposição de feromônios principalmente pelas comissuras labiais, face, coxins plantares e urina no momento em que realizam a marcação territorial pelo movimento facial ou contato do leito ungueal em objetos ou pessoas e marcação urinária (HENZEL, 2014).

Em cães, os feromônios sintéticos têm indicação para redução da ansiedade em decorrência da separação do dono, facilitar aprendizado de filhotes, melhorar a

socialização, diminuição do medo e excitabilidade. Esta substância mimetiza o feromônio produzido pela cadela lactante (HENZEL, 2014).

Outrora, em equinos há produção do feromônio materno equino (FME) que foi isolado da secreção sebácea próximo as glândulas mamárias imediatamente após o parto. O número de estudos relacionados ao seu uso aumentou consideravelmente nos últimos anos. O FME não só envia sinais calmantes, mas também serve como um guia para o recém-nascido encontrar o úbere facilitando assim a sucção e intensificando assim a relação da égua com o potro (COZZI et al., 2011).

Os análogos sintéticos de feromônios vem sendo utilizados para reduzir problemas relacionados ao comportamento dos animais, e em situações envolvendo um alto potencial de estresse (COZZI et al., 2012; HENZEL, 2014) onde os animais apresentam ansiedade e fobia (GAULTIER et al., 2005).

É considerada uma substância que não interfere na capacidade cognitiva e de memorização e por isso é considerada ideal para atividades que requerem estes fatores (MENDONÇA; MENGOLI, 2014).

2.3 MECANISMO DE DETECÇÃO DOS FEROMÔNIOS

Os mamíferos desenvolveram um mecanismo de condução destas moléculas em suspensão até o órgão vomeronasal (OVN). Este mecanismo, denominado como Reflexo de Flehmen é caracterizado como um movimento de elevação e extensão da cabeça, retração do lábio superior e exposição da gengiva sem movimentação da articulação-têmporo-mandibular, o que permite a inalação da substância em questão (CROWELL-DAVIS; HOUPPT, 1985).

Além do OVN a detecção dos feromônios podem ocorrer através do epitélio olfatório principal (EOP). O epitélio olfatório principal (EOP) juntamente com o bulbo olfatório principal (BOP) e suas projeções constituem o sistema olfatório principal (SOP), que é capaz de perceber uma diversidade de odores, incluindo alguns feromônios. O OVN em conjunto com o bulbo olfatório acessório (BOA) e suas projeções, compõem o sistema olfatório acessório (SOA) (DIAS; SILVA; MATTOS, 2008).

O OVN, é uma estrutura tubular de extremidade cega bilateral dividida pelo septo nasal, geralmente localizada diretamente acima da cavidade oral (CO), na base da cavidade nasal (CN). Seu lúmen é revestido por neurônios receptores, geralmente preenchidos por fluido oriundo das glândulas vomeronasais, as quais apresentam ductos secretórios localizadas nas paredes dorsais e ventrais do lúmen vomeronasal. Lateralmente ao lúmen, são visualizados vasos e seios sanguíneos inervados por fibras do sistema nervoso autônomo. Na sua superfície convexa encontra-se uma fileira de células ciliadas não sensoriais (DIAS; SILVA; MATTOS, 2008).

O tamanho do referido órgão e seu desenvolvimento variam de acordo com a espécie animal (SCHNEIDER et al., 2008). Em roedores situa-se dentro da CN, em gatos dentro do canal nasopalatino, o qual conecta as CN e CO e em bovinos abre-se diretamente na CO (DUKES, 2006). Nos equinos não existe comunicação entre as CN e CO. Os ductos incisivos são fechados em cada lado da CO e continuam caudalmente com um canal em fundo cego, dando origem ao VN (PAGEAT, GAULTIER, 2003; BERGER et al., 2012). Em cetáceos, alguns morcegos e alguns primatas o VN está ausente. Em alguns humanos adultos podem existir cavidades vomeronasais portanto, sem tecido neural (IBARRA-SORIA; LEVITIN; LOGAN, 2014). No entanto, estudos sugerem que a espécie ainda pode perceber certos feromônios, por exemplo, em mulheres que vivem próximas pode ocorrer uma sincronização de ciclos menstruais (BERGER et al., 2013).

Os efeitos fisiológicos e hormonais da estimulação feromonal ocorrem através de projeções dos neurônios para o BOA. O BOA envia axônios para o núcleo medial da amígdala (MeA), núcleo posterior cortical da amígdala (PCoA), núcleo próprio do trato olfatório acessório e para o núcleo próprio da estria terminal (BNST – *bed nucleus of the stria terminalis*). O núcleo MeA possui projeções para o BNST e para a área pré-optica medial (APOM), bem como para o hipotálamo ventromedial (VMH). Já o PCoA tem projeções para o núcleo periventricular anteroventral (AVPV), VMH e projeções indiretas para a APOM, estando assim relacionadas com a modulação e comportamentos sociais e reprodutivos (DIAS; SILVA; MATTOS, 2008).

Existem convergências entre as projeções do SOA e o SOP isso significa que tanto o BOP quanto o BOA se projetam para vias consideradas apenas do SOP (núcleo lateral do trato olfatório, amígdala cortical anterior) ou apenas do SOA

(amígdala anterior ventral, núcleo próprio do trato olfatório acessório e núcleo anteroventral medial da amígdala)(DIAS; SILVA; MATTOS2, 2008).

Na figura 1, pode-se observar a posição e conexões do OVN em um roedor (hamster) para ilustrar a organização geral em mamíferos. O diagrama mostra o OVN localizado dentro de uma protuberância longitudinal ao lado esquerdo do septo nasal. Os neurônios sensitivos vomeronasais compõem um grupo sensorial de células (fornecem o sentido do olfato) revestindo uma cavidade longa (lúmen) dentro da cápsula óssea fina que envolve o órgão. O ducto estreito, que se abre para o assoalho da cavidade nasal logo abaixo da narina, é o único acesso para os semioquímicos. Os neurônios sensoriais vomeronasais de mamíferos detectam substâncias químicas específicas, algumas das quais podem atuar como sinais de comunicação de outros indivíduos da mesma espécie e desencadear a geração de impulsos elétricos que transportam as informações para o cérebro (DIAS; SILVA; MATTOS2, 2008).

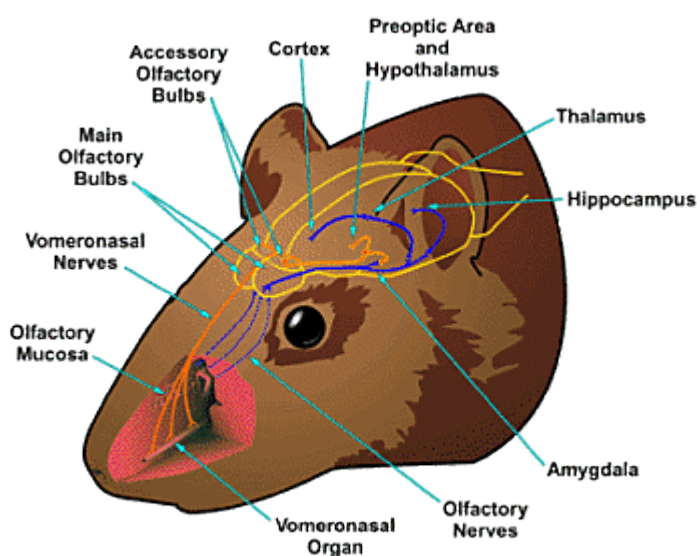


Figura 1. OVN de mamíferos (Fonte: <http://www.justpetcats.com/cat-behavior/the-flehmen-response-in-cats/>)

O hipotálamo é uma das mais importantes regiões do cérebro, reconhecidamente envolvida no processamento de feromônios e também no controle de funções hormonais e endócrinas (BEHR, 2009), possui conexão com muitas partes do SNC, incluindo o hipocampo, o núcleo amilóide, e os lobos frontais do córtex. A percepção dos odores atua não só nas fases do processo reprodutivo, como também

no reconhecimento do parceiro no comportamento sexual e durante a realização de comportamentos maternos envolvendo mãe-filhote (DIAS; SILVA; MATTOS, 2008).

2.4 O SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO E A VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA COMO INDICADOR DE ESTRESSE

O sistema nervoso pode ser dividido em duas partes: o sistema nervoso central (SNC), que inclui encéfalo e medula espinhal, e o sistema nervoso periférico (SNP), que consiste em nervos cranianos e nervos espinhais que se conectam com estruturas somáticas. Além disto, distingue-se o sistema nervoso autônomo (SNA), que coordena a atividade das estruturas viscerais (músculo liso, músculo cardíaco e glândulas). O SNA tem elementos no SNC (tronco encefálico) e no SNP (medula espinhal), e ambos possuem componentes sensitivos e motores (FRADSON; WILKE; FAILS, 2005).

Apresenta duas divisões clássicas, simpática e parassimpática. A divisão simpática do SNA prepara o organismo para enfrentar o estresse produzido por uma combinação de alterações fisiológicas frequentemente denominada resposta de luta ou fuga. A divisão parassimpática do SNA é em muitos casos antagônica a divisão simpática e é responsável em promover digestão e armazenamento de glicogênio, proporcionando ao organismo um estado de repouso (FRANDSON, WILKE, FAILS 2003).

A resposta biológica à um estímulo estressor é dividida em três estágios: reconhecimento do agente estressor, defesa biológica contra o agente estressor e consequências da resposta ao estresse (Figura 2).

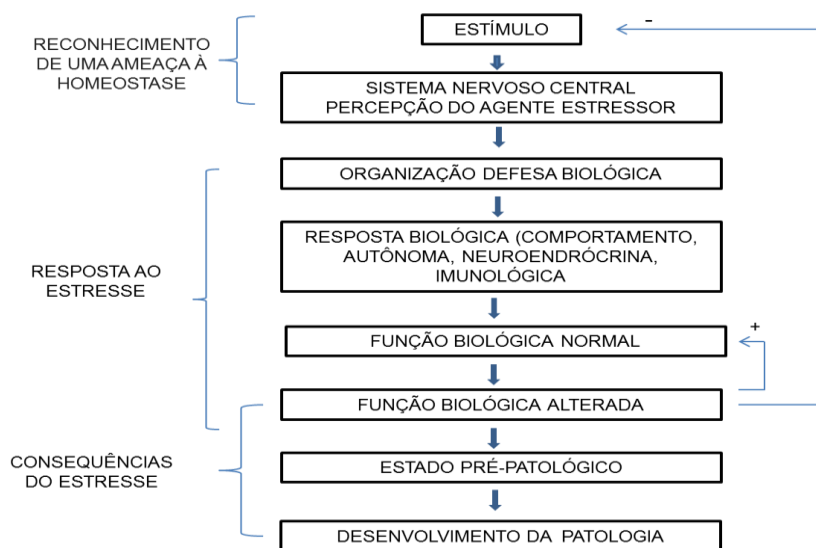


FIGURA 2: Modelo biológico de resposta animal ao estresse (Fonte: Moberg, 2000).

Inicialmente o animal tenta evitar o estímulo estressor mantendo-se no mesmo local. Posteriormente, há ação do mecanismo de luta ou fuga, que ativa o sistema cardiovascular, gastrointestinal, glândulas exócrinas e medula adrenal (MOBERG, 2000).

A síndrome de luta ou fuga é caracterizada pela ativação do SNS que estimula a medula adrenal ocasionando um aumento na secreção das catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), e, conseqüentemente aumento na FC, circulação sanguínea em músculos esqueléticos, diminuindo, desta forma, as reservas de glicogênio para aumentar a energia disponível. As catecolaminas são secretadas rapidamente em momentos críticos, proporcionando ao organismo a possibilidade de reação muito rápida (MOBERG, 2000).

A frequência cardíaca responde dinamicamente a alterações fisiológicas mediada pelo SNA através de impulsos nervosos eferentes vagais e simpáticos, (CRUZ-ALEIXO, 2017) de forma intrínseca e extrínseca. A modulação intrínseca decorre dos disparos rítmicos determinados pelo nodo SA que, posteriormente, percorrem todo o tecido cardíaco, e a regulação extrínseca pela inervação autonômica simpática e parassimpática (JENSEN-URSTAD et al., 1997).

Alterações na atividade cardíaca podem ser fortemente influenciadas pelo comportamento, portanto esta observação torna-se difícil de ser realizada devido aos padrões comportamentais entre espécies não serem padronizados, tornando a análise subjetiva. Um outro fato a se considerar é que, as alterações da atividade cardíaca

podem ocorrer antes de qualquer alteração de comportamento ou até mesmo depois. Por exemplo, algumas aves desenvolvem taquicardia antes de realizar um voo (BORELL et al., 2007).

A influência do SNA sobre o coração ocorre por quimiorreceptores, barorreceptores, receptores atriais e ventriculares, sistema respiratório, sistema vasomotor, sistema renina-angiotensina-aldosterona e, entre outros, sistema termorregulador. O controle autonômico cardíaco está intimamente ligado à FC, a qual sofre flutuações fisiológicas batimento a batimento. Esse mecanismo de controle ocorre através de vias aferentes medulares e vagais, onde a informação que atinge o SNC é modulada e retorna ao coração pelas fibras eferentes vagais rápidas e eferentes simpáticas lentas. Como a dissipação da noradrenalina, liberada nas terminações simpáticas, é mais lenta que a da acetilcolina nas terminações vagais, essa diferença na velocidade de transmissão nas vias colinérgicas e adrenérgicas resultarão em desigualdades na frequência de modulação desses dois sistemas no nodo SA (ZHOU et al., 2015).

Por ser considerada um grande indicador para verificar a atividade do SNA, a VFC vem sendo correlacionada com a resposta comportamental em animais frente a agentes estressores, condições patológicas, práticas de manejo, regimes de treinamento bem como o comportamento e temperamento em várias espécies de animais de fazenda e de companhia. Tornou-se uma ferramenta de estudo de grande importância na última década e fez com que vários grupos de estudo em cardiologia, se unissem para identificar e compreender através de pesquisas, a capacidade da mesma em avaliar estresse e BEA (BORELL et al., 2007).

Estudos demonstraram a utilidade da análise da VFC no domínio do tempo como um indicador da atividade simpática durante um período de tensões físicas e psicológicas (KUWAHARA et al., 2004; BORELL, 2007). Indivíduo com baixo tônus vagal apresenta-se mais vulnerável ao estresse. Uma alta atividade vagal tem sido associada à regulação autonômica eficiente, o que permite um organismo aumentar sua sensibilidade em respostas aos desafios ambientais e fisiológicos (BORELL, 2007).

A VFC descreve as oscilações dos intervalos entre os batimentos cardíacos consecutivos (intervalos RR). Como ferramenta de pesquisa, a avaliação da VFC tem permitido o melhor entendimento da participação do SNA em diferentes situações

fisiológicas, patológicas e terapêuticas (CRUZ-ALEIXO, 2017). Estudos têm demonstrado que a diminuição da VFC está relacionada com um maior índice de morbidade e mortalidade cardiovascular em humanos (ABREU, 2012; LOTUFO et al., 2012).

A ativação do SNS resulta em maior cronotropismo, inotropismo e dromotropismo cardíaco, além de redistribuir a circulação sanguínea e ativar sistemas como o renina-angiotensina-aldosterona, preparando o organismo para situações de estresse (NETO, 2011).

Em contrapartida, a ativação parassimpática modula, de maneira inversa, essas variáveis, constituindo, desta forma, o balanço autonômico cardíaco. A variação dos intervalos de despolarização cardíaca, provida pela influência autonômica, pode ser detectada ao eletrocardiograma pelas diferentes distâncias entre as ondas R normais (intervalos RR ou NN) (PASCON, 2009; SCHWAB et al., 2004). A VFC é o método que quantifica essas variações, permitindo a observação das flutuações no ciclo cardíaco que ocorrem durante curtos períodos de tempo ou, em períodos longos inferindo sobre a modulação autonômica cardíaca (ROQUE, 2009). A avaliação da VFC é, portanto, um instrumento não invasivo e útil para análise da função autonômica (DOXEY, BOSWOOD, 2004).

Embora existam vários métodos para determinação dos índices de VFC, utiliza-se principalmente a VFC no domínio do tempo, que se baseia em cálculos estatísticos, ou domínio da frequência, no qual as frequências cardíacas são transformadas em potência (PASCON, 2009).

O método linear no domínio de tempo, expressa resultados em unidade de tempo (milissegundos), medindo-se cada intervalo RR normal durante um determinado intervalo de tempo, logo depois utiliza-se métodos estatísticos ou geométricos (média, desvio padrão e índices derivados histograma ou do mapa coordenadas cartesianas dos intervalos RR), calculando-se os índices tradutores de flutuações na duração dos ciclos cardíacos (CALVERT, 1998; CRUZ-ALEIXO, 2017).

Os índices estatísticos, no domínio do tempo, obtidos pela determinação de intervalos RR correspondentes em qualquer ponto no tempo, são: (AUBERT, 2003).

a) SDNN - Desvio padrão de todos os intervalos RR normais gravados em um intervalo de tempo, expresso em ms;

- b) SDANN - Representa o desvio padrão das médias dos intervalos RR normais, a cada 5 minutos, em um intervalo de tempo, expresso em ms;
- c) SDNNi - É a média do desvio padrão dos intervalos RR normais a cada 5 minutos, expresso em ms;
- d) rMSSD - É a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes, em um intervalo de tempo, expresso em ms;
- e) pNN50 - Representa a porcentagem dos intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50ms.

Os índices SDNN, SDANN e SDNNi são obtidos a partir de registros de longa duração e representam as atividades simpática e parassimpática, porém não permitem distinguir quando as alterações da VFC são devidas ao aumento do tônus simpático ou à diminuição do tônus vagal (NOVAIS et al., 2004). Já os índices rMSSD e pNN50 representam a atividade parassimpática (PUMPRLA, 2002; AUBERT, 2003; BITTENCOURT et al 2005; RIBEIRO, 2005), pois são encontrados a partir da análise de intervalos RR adjacentes (CRUZ-ALEIXO, 2017).

O método no domínio da frequência consiste em um método espectral que decompõe um tacograma (gráfico de intervalo RR X batimentos cardíacos) nas várias frequências espectrais pré-estabelecidas com seus respectivos pesos de contribuição para o sinal, gerando, desta forma, um gráfico de densidade de potência espectral em função da frequência. Este gráfico possui os componentes espectrais de muito baixa frequência (*very low frequency - VLF*), baixa frequência (*low frequency - LF*) e alta frequência (*high frequency - HF*) (SELIG, 2011; SOWMYA et al., 2014).

Em equinos adultos, de acordo com Von Borell et al. (2007), altas frequências são definidas entre 0,13-0,26 Hz (corresponde a uma taxa respiratória de 8 a 16 mpm), enquanto que nos neonatos são entre 0,25-0,33 Hz (correspondente a uma taxa respiratória entre 15 e 20 mpm).

Os componentes RMSSD e HF estão bem estabelecidos como sendo a expressão da modulação vagal cardíaca (atividade parassimpática). Por sua vez, componente LF tem sua interpretação controversa, sendo que alguns autores postulam que o componente representa a atividade vagal parassimpática e a função barorreflexa; outros suportam que o LF é a representação da atividade simpática, parassimpática e função barorreflexa e, há também aqueles que afirmam refletir a

atividade simpática e parassimpática, com maior atuação da simpática (MONTEZE, 2014; RASSI, 2010).

A teoria do Caos descreve elementos manifestando comportamentos que são extremamente sensíveis às condições iniciais, dificilmente se repetem, mas apesar de tudo são determinísticos (GODOY, 2005).

As teorias dos sistemas não-lineares têm sido progressivamente aplicadas para interpretar, explicar e prever o comportamento dos fenômenos biológicos. Esses parâmetros têm se mostrado bons preditores de morbi-mortalidade no âmbito clínico, apesar da necessidade de aprofundamento científico, com amostras expressivas e acompanhamento prolongado. Tais estudos poderão ser úteis na investigação e no tratamento de cardiopatias (GODOY, 2005).

3. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos do FME em equinos jovens submetidos ao procedimento de casqueamento, a fins de verificar se houve ou não influência do FME no comportamento dos animais, empregando para tanto a análise de VFC pelo método de Holter.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar se o uso do FME favoreceu a relação homem versus animal e conseqüentemente o bem-estar animal.

Identificar entre dois grupos (tratamento cego) qual recebeu o FME e o placebo por meio de avaliação de parâmetros clínicos, laboratoriais e comportamentais.

CAPÍTULO II
ARTIGO CIENTÍFICO

1 Trabalho a ser enviado para a revista **Journal of Veterinary Behavior**. Normas disponíveis
2 no site: <https://www.journalvetbehavior.com/content/authorinfo>

3

4 **Study on the effects of the equine maternal pheromone on the clinical and**
5 **ethological parameters of equines undergoing hoof trimming**

6

7 Renata Alves de Paula¹, Amanda Sarita Cruz Aleixo², Letícia Peternelli da Silva³, Marina
8 Cecília Grandi⁴, Miriam Harumi Tsunemi⁵, Maria Lucia Gomes Lourenço⁶, Simone Biagio
9 Chiacchio⁷

10

11 ¹School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Health, UNESP, Botucatu, São Paulo,
12 Brazil; email: *Corresponding author: medvetrenata@hotmail.com

13 ²School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Health, UNESP, Botucatu, São Paulo,
14 Brazil; email: amanda.cruz21@hotmail.com

15 ³School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Health, UNIMAR, Marília, São Paulo,
16 Brazil; email: leticia_pet@hotmail.com

17 ⁴Diplomate in Veterinary Medicine, Lençóis Paulista, São Paulo, Brazil; email: grandi_vet@yahoo.com.br

18 ⁵Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, São Paulo, Brazil; *Corresponding author: mtsunemi@ibb.unesp.br

19 ⁶School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Veterinary Clinics, UNESP, Botucatu, São
20 Paulo, Brazil; *Corresponding author: mege@fmvz.unesp.br

21 ⁷School of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Health, UNESP, Botucatu, São Paulo,
22 Brazil; email: chiacchios@fmvz.unesp.br

23

24 **Abstract**

25 Pheromone therapy is a promising alternative therapy to improve the human-animal
26 relationship and reduce behavioral reactions to stressful stimuli. This study aims at
27 evaluating the use of the equine maternal pheromone (EMP) in animals undergoing
28 hoof trimming and verify a possible influence of the pheromone over the autonomous
29 nervous system. For this purpose, 20 foals (14 females and 6 males) with an average
30 age of 24 months were divided into two experimental groups (A and B), one group
31 receiving treatment with EMP and the other receiving placebo (excipient without the
32 active ingredient). The parameters analyzed were heart rate (HR), respiratory rate
33 (RR), blood sugar levels, heart rate variability (HRV) and behavioral reactions. The

34 results revealed no statistically significant differences in the clinical parameters (HR,
35 RR, and blood sugar levels)) when comparing the EMP and placebo groups. The HRV
36 indexes (Minimum HR, Average HR, Maximum HR, NN, SDNN, RMSSD, and PNN50)
37 also did not present statistically significant differences when comparing the groups
38 before, during and after trimming. Despite the absence of statistical significance, we
39 observed a strong tendency towards lower HR, blood sugar levels and reactivity in the
40 group treated with EMP, in addition to an evident behavioral change during trimming,
41 making the animals calmer and the procedure more comfortable.

42

43 **Keywords:** animal well-being, HRV, behavior, pheromone therapy, hoof trimming

44

45 **Introduction**

46

47 The interest with animal well-being has been on the rise both in Brazil and around the
48 world as several sectors of society have become more organized to demand better
49 conditions in animal husbandry (Gontijo et al., 2014).

50

51 These conversations have been, in part, focused on equestrian activities, which adds
52 value to studies using a scientific approach to determine in which situations animal
53 quality of life and well-being may improve and, therefore, determine new methods that
54 may have a positive impact in the animal husbandry systems (Gontijo et al., 2014).

55

56 Since the time humanity has first interfered in the biology and nature of equines, some
57 methods have been introduced to the handling of these animals, including intensive
58 care with the hoof. Hoof trimming is a procedure that should be conducted chiefly in
59 horses held in stable, which require daily care to maintain hygiene and balance
60 (Sampaio; Silva, 2013).

61

62 Equines show varying temperaments, which are defined as the animal's response to
63 human handling, usually associated with fear and sometimes leading to behavioral and
64 physiological changes. New situations, intense stimuli and sudden actions may cause
65 fear in the animal. These behavioral responses or changes range from low reactivity
66 and meekness to fear, escape attempts or aggression (Calviello, 2013). When these

67 situations become traumatic and stressful, the well-being of the animal has apparently
68 been compromised (Heleski et al., 2002).

69

70 Stress may lead to increases in heart rate (HR) due to the activation of the Sympathetic
71 Nervous System (SNS) and the release of catecholamines. The discovery of the
72 relationship with the autonomic nervous system (ANS) led to studies regarding the
73 increase in sympathetic activity and the resulting decreases in parasympathetic
74 activity, with heart rate variability (HRV) representing the most promising marker for
75 ANS activity. However, the evaluation of responses to stress is better conducted by
76 comparing behaviors and physiological measurements (Cruz-Aleixo, 2017).

77

78 Neuroleptic, sedative and tranquilizing substances are often administered to equines
79 to facilitate certain types of handling, but they often lead to collateral effects such as
80 hematological and biochemical alterations which compromise homeostasis. For this
81 reason, some studies have been conducted regarding the use of pheromone therapy
82 to calm the animals and reduce fear and anxiety without causing any adverse effects
83 (Falewee et al., 2006).

84

85 Studies have already proved the effectiveness of pheromones in several animal
86 species, including canines, felines, swines and leporids (Heleski Et Al., 2002; Gaultier
87 et al., 2005; Dalacqua; Barros, 2006; Pageat, 2008; Maia et al., 2013; Ibarra-Soria;
88 Logan, 2014; Stowers; Kuo, 2015; Jouhanneau; Schaal; Coureaud, 2016). Their
89 effectiveness in equines have been studied in isolated cases, but it represents a
90 promising tool to optimize handling, facilitate the relationship between human and
91 animal and promote animal well-being (Heleski et al., 2002; Falewee et al., 2006; Cozzi
92 et al., 2011).

93

94 Therefore, this study aims at determining if the use of EMP had a positive impact on
95 the human-animal relationship and animal well-being, as well as identifying which
96 experimental group received the treatment with EMP through the evaluation of clinical,
97 laboratory and behavioral parameters.

98

99

100 **Materials and Methods**

101

102 *Experiment location*

103 The study was conducted at two stud farms in the midwestern region of the state of
104 São Paulo, Brazil. The first, identified as *Fazenda Santa Fé*, is located in the city of
105 Areiópolis, SP – Brazil (latitude 22°40'05" S & longitude 48°39'54" W), and the second,
106 identified as *Haras Josilmar*, is located in the city of Bauru, SP – Brazil (latitude
107 22°18'55" S & longitude 49°3'41" W). The study was approved by the Ethics
108 Commission for Animal Experimentation (CEUA, *Comissão de Ética no Uso de*
109 *Animais*) at the School of Veterinary Medicine and Animal Sciences (FMVZ – UNESP,
110 Botucatu, Brazil) under protocol no. n°0214/2016 after written consent by the animal
111 owners.

112

113 *Animals*

114 The study included 20 Mangalarga Paulista horses, 14 females and 6 males, with an
115 average age of 24 months. The inclusion criteria for the study were animals that were
116 healthy upon a physical examination, no history of infectious or contagious diseases
117 in the previous 30 days, regular vaccination and deworming, age between 12 and 28
118 months, uninitiated taming process and no previous hoof trimming.

119

120 All animals came from similar husbandry systems: free-roaming in Tifton fields with
121 water and mineral salts ad libitum. For this study, the foals were gathered in a handling
122 corral, subdued and led to a horse stock for the procedures to begin.

123

124 *Synthetic Pheromone*

125 The manufacturer provided the product in syringes identified as A or B on the outside
126 Figure 3). One group contained a synthetic equivalent of the equine maternal
127 pheromone (EMP 1%) and an excipient (Glycerol, Methyl Hexadecanoate, 2-Tert-
128 Butyl-Cresol 99%), while the other contained only the excipient (Glycerol, Methyl
129 Hexadecanoate, 2-Tert-Butyl-Cresol 99%) without the active ingredient, which is
130 considered a placebo. The researchers did not know which syringe contained what
131 until the end of the experiment.

132 The carton contained 2.5 ml of a gel, which was distributed over the examiner's index
133 finger and the applied over the outer edge of the animal's nostril, one unit for each
134 nostril. The examiners used gloves for each application, discarding them afterward as
135 per the manufacturer's instructions (Figure 3).

136

137 *Clinical parameters*

138 The study assessed the heart rate (HR) and respiratory rate (RR) of the animals
139 through a conventional clinical examination with the aid of a stethoscope. Values
140 between 32 and 44 beats per minute for the HR and between 8 and 15 movements
141 per minute for the RR were considered normal (Cunningham, 1999). Blood sugar
142 levels were determined with the aid of a portable device (Accu-Chek® Performa –
143 Marca Roche), using specific bands, after collection through jugular venipuncture with
144 5 mL syringes and 30x10 needles. Values were considered normal between 75 and
145 115 mg/dL (Kaneko, 2008). These parameters were evaluated at two moments: M1 –
146 20 minutes before the application of the EMP; and M2 – after the trimming procedure.

147

148 *Heart Rate Variability (Holter)*

149 The electrocardiographic recording happened after the application of a Holter device
150 (Cardio Light, Cardios, ANVISA, São Paulo, Brazil) (Figure 4). The area was epilated
151 and cleaned with 70% alcohol before the electrodes were secured with the aid of glue
152 (Super Bonder®- Loctite).

153 The positive electrodes (red and black) were positioned on the animal's left side, with
154 the red electrode placed at the withers and the black electrode in the ventral region of
155 the thorax, in the fifth intercostal space behind the olecranon. The negative electrode
156 (white) and the ground electrode (green) were positioned in the middle third of the
157 seventh intercostal space on the right thorax, with the green electrode positioned
158 slightly closer than the white electrode (Figure 5).

159

160 The recorder was then secured at the animal's neck with an elastic band to protect the
161 equipment (Figure 5). The data collected was stored in an electromagnetic card (SD
162 card) (Figure 4).

163

164 The time-domain HRV indexes are shown in Chart 1 and were analyzed in all animals
165 through computer-based decoding of the Holter electrocardiographic monitoring
166 employing the software CardionetClient® at three distinct moments: before, during and
167 after the hoof trimming procedure.

168

169 *Experimental design*

170 After the clinical examination and blood sugar level test, the Holter device was placed
171 on the animal and the electrocardiographic recording initiated. After recording for 20
172 minutes, the product was administered. The first animal, selected at random by the
173 handler, was given the contents of syringe A (Group A) and the second animal was
174 given the contents of syringe B (Group B) and so on until all animals received the
175 product. All applications were conducted by the same person.

176 A 20-minute wait period was observed after application (as per the product's minimum
177 action time), during which the animals were not in contact with humans or other
178 animals.

179

180 Hoof Trimming

181 A preventive hoof trimming procedure was then conducted on the animals employing
182 a hoof cleaner, a hoof knife, a rasp and a pincer (Figure 6). The procedure consisted
183 in cleaning the hoof with the cleaner, removing all dirt. The hoof knife was then used
184 to carefully remove excess material from the sole, the central groove of the frog and
185 the white line. The hoof wall was then trimmed with the pincer and leveled with the sole
186 with a rasp. The procedure was finalized by rounding the hoof.

187

188 The procedure was conducted by the same person and followed the same limb order
189 in all animals: right thoracic limb (RTL), right pelvic limb (RPL), left thoracic limb (LTL)
190 and left pelvic limb (LPL) (Figure 7). After concluding the procedure, the clinical
191 examination and the blood sugar level test were repeated. After another 20-minute
192 wait period, the cardiac monitoring device was removed, with a total recording time of
193 approximately 20 minutes per animal.

194

195

196

197 *Behavioral parameters*

198 The trimming procedures were recorded with a digital camera (iPhone 7 – Full HD
199 1080p –Apple) and two observers identified and recorded the behavioral reactions of
200 each animal, in particular: walking backwards, running away, walking sideways, hitting,
201 kicking, stepping, dropping their weight over the limb, putting the tail between the legs
202 and prancing.

203 The entire sequence of the experiment is represented in Figure 8.

204 *Statistical analysis*

205 Variable distribution was evaluated through Kolmogorov-Smirnov's normality tests.
206 Comparisons between the groups employed the t-test for independent samples. The
207 significance level adopted for the study was 0.05.

208

209 **Results**

210

211 The study was conducted as a blind trial and the treatment received by each animal
212 was revealed upon the end of the experiment: animals in Group A received the placebo
213 and animals in Group B received treatment with EMP.

214 To measure the effects of the EMP and the placebo, twenty animals were evaluated
215 regarding their physiological parameters (HR, RR, Blood sugar levels and HRV) and
216 their behavior. However, there was a problem with the HRV data recording of four
217 animals, which were excluded from the study.

218

219 *Clinical examination*

220 The data obtained through conventional clinical examinations did not reveal any
221 statistically significant difference within the EMP and Placebo groups for the HR, RR
222 and Blood Sugar Level parameters when comparing moments M1 and M2, as
223 described in Table 1.

224

225 *Heart Rate Variability*

226 In the Holter examination, the Minimum HR in the placebo group (45.00 ± 10.28),
227 Minimum HR in the EMP group (41.20 ± 7.89), Average HR in the placebo group (63.60
228 ± 25.16), Average HR in the EMP group (64.80 ± 22.89), Maximum HR in the placebo
229 group (112.40 ± 31.44) and Maximum HR in the EMP group (122.30 ± 47.60) also did

230 not present statistically significant differences ($p>0.05$) between the three analyzed
231 moments (before, during and after hoof trimming) (Table 2).

232

233 Likewise, the remaining HRV indexes (NN, SDNN, RMSSD and PNN50) also did not
234 present statistically significant differences for each group between the three analyzed
235 moments: before (M1), during (M2) and after (M3) hoof trimming. This data are shown
236 in Table 3.

237

238 *Behavioral reactions*

239 According to the analyses conducted by the observers, there were noticeably more
240 behavioral reactions in the placebo group, indicating higher reactivity in this group
241 during trimming. However, the statistical analysis did not reveal any statistically
242 significant differences, as was the case in the other results described so far, which may
243 be explained by the number of samples included in the study.

244

245 **Discussion**

246

247 In this study, the HR of the foals in both the EMP and Placebo groups started above
248 the reference values described for the species in the clinical examination conducted at
249 rest, before handling to secure the Holter device and before the trimming procedure.
250 This indicates that the animals were already in an alert state, which may be explained
251 by the fact that they had been restrained. An animal may undergo physiological
252 changes when feeling insecure in a particular situation, which highlights the importance
253 of studying parameters such as HR, which is an expression of emotional activation
254 (Visser et al., 2002).

255

256 Despite not being a statistically significant difference, the HR in the EMP group was
257 higher at M1 (64.80 ± 14.34) and then decreased at M2 (55.60 ± 14.78), a difference
258 of -9.20 beats per minute. Some studies report that differences exceeding 6 beats per
259 minute from the measurement taken at rest may indicate stress (Craig; Nunan, 1998).
260 This indicates that the EMP can aid the physiological adaptation process to which the
261 animals were submitted. On the other hand, the placebo group behaved in the opposite
262 way. Increases in the HR are the result of reduced vagal activity and increased

263 sympathetic activity or, in some cases, a combination of concomitant changes in both
264 branches of the ANS (Borell et al., 2007).

265

266 When comparing the blood sugar levels of each group between moments M1 and M2,
267 the differences observed were not statistically significant. As was the case with the HR,
268 the EMC presented higher values before the trimming procedure than afterward, with
269 a difference of -7.90 mg/dL (Table 1). In the placebo group, the blood sugar levels
270 remained similar at M1 and M2.

271

272 The levels of sugar in the blood in stress situations are related to an increase in the
273 levels of cortisol because when there is a stress stimulus, the hypothalamus
274 synthesizes the corticotropin-releasing hormone (CRH), which induces the hypophysis
275 into producing the adrenocorticotrophic hormone (ACTH). The ACTH, in turn, runs
276 through the bloodstream to the adrenal glands, stimulating the synthesis of cortisol,
277 which is known as the “stress hormone.” At the same time, the SNS is activated,
278 leading to the release of catecholamines (noradrenaline and adrenaline), leading to an
279 increase in glycogenolysis (Mendes; Nascimento, 2009).

280

281 The analysis of the indexes obtained through the Holter examination revealed the
282 minimum, average and maximum HR was high in both groups, but it is known that, in
283 some cases, the HR may rise quickly to over 100 bpm, especially in cases involving
284 sudden fear, excitation or before physical exercise (Clayton, 1991; Evans, 1994).

285

286 The remaining indexes reflect the variability in the cardiac activity and are influenced
287 by sympathetic and parasympathetic activity (Borrell et al., 2007). The index SDNN is
288 obtained from long recordings and represents both sympathetic and parasympathetic
289 activity, but it does not allow the distinction of whether the HRV changes are caused
290 by increases in the sympathetic tonus or reductions in the vagal tonus. On the other
291 hand, the indexes RMSSD and pNN50 represent parasympathetic activity given that
292 they are calculated from the analysis of adjacent RR intervals (Vanderlei et al., 2009).
293 High heart rate variability is a sign of good adaptation, characterizing a healthy
294 individual with efficient autonomic mechanisms, while low variability often is an
295 indicator of abnormal and insufficient ANS adaptation, implying the presence of some

296 physiological 'malfunction' in the individual (Abreu, 2012). A problem in the data
297 recording of four animals during the procedure compromised the statistical analysis
298 since the number of samples analyzed in this study may have been a relevant factor.
299 Therefore, the evaluation of a response to stress should be conducted associating
300 physiological and behavioral measurements (Broom, 1991; Mason e Mendle,1993).

301

302 Although the statistical analysis also did not reveal significant differences regarding
303 behavior, the observers who analyzed the videos reported much more reactivity in
304 animals from the placebo group. Also, both groups had fleeing as the most common
305 reaction in this situation, as shown in Figure 10 and 11.

306

307 During the hoof trimming procedure, we noticed that two animals in the EMP group
308 that had a history of high reactivity before humans, with exaggerated reactions
309 (kicking) when feeling threatened, were handled without any problems during the
310 experiment.

311

312 Equines have a considerably high learning ability, and this has a substantial impact in
313 the initial stages of handling and training. The more conditioned the animal is to a
314 particular situation; the easier handling will be if the first instance was free of fear.
315 However, positive reinforcement facilitates understanding, leading to positive
316 behaviors and reactions during the subsequent handling (Mengoli et al., 2014). In this
317 study, the animals were young and untamed, with most accepting handling only with a
318 halter. Considering that most animals had never undergone hoof trimming and,
319 therefore, did not go through the learning procedure, the expected result was a high
320 reactivity level in all animals since the procedure would be interpreted as a threat,
321 especially during restraint.

322

323 Another study regarding equines submitted to a fear-inducing situation under the
324 effects of the EMP employed a heart rate sensor (Polar® Horse Trainer Advanced TM).
325 The results were similar to the ones observed in this study regarding the HRV as it also
326 did not find any statistically significant differences with the use of the EMP. The authors
327 also reported a loss of HR data due to a recording error, which compromised the
328 analysis. However, according to the authors, the average and maximum HR were lower

329 during the study in the group treated with EMP. Also, they have reported success in
330 the analyses related to performance and behavior, proving that the EMP was useable
331 for specific tasks that induce fear and anxiety.

332

333 **Conclusion**

334 These results suggest that pheromone therapy could be an efficient alternative to be
335 employed in situations with high-stress potential for equines. The use of EMP produced
336 favorable results in the handling for a hoof trimming procedure, in particular reducing
337 the number of behavioral reactions and improving the human-animal relationship
338 during the procedures. Also, it was possible to detect through the experimental findings
339 that the syringes containing EMP were those identified with a letter B, a result that was
340 later confirmed by the manufacturer.

341

342 **Acknowledgments**

343 To IRSEA - Research Institute in Semiochemistry and Applied Ethology, for allowing
344 the study and providing products used in the experiment.

345

346 To the owners of Haras Josilmar and Fazenda Santa Fé, who granted us their facilities
347 and employees to help with the experiment.

348

349 **Conflict of Interest Statement**

350 The authors declare they have no conflicting interests.

351

352 **Authorship**

353 The concept for the article was conceived by Renata Alves de Paula. The experiment
354 was designed and conducted by all the authors. The data was analyzed by Miriam
355 Harumi Tsunemi. The article was written by all authors.

356

357

358

359

360

361

362 **References**

363

364 ABREU, L.C. Variabilidade da Frequência Cardíaca como marcador funcional do
365 desenvolvimento. *Journal of Human Growth and Development*, v.22, n.3, p.279-
366 282, 2012.

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

370 BROOM, D.M. Animal welfare: concepts and measurement. *Journal of Animal*
371 *Science*, v.69, n.10, p.4167-4175, 1991.

372 CALVIELLO, R. F. Avaliação da reatividade de equinos durante o manejo e na
373 presença de estímulo desconhecido. Dissertação apresentada à Faculdade de
374 Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, Pirassununga,
375 2013.

376 CRAIG N., NUNAN, M. Entrenamiento del ritmo cardiaco para caballos.
377 *Performance Matters*, Adelaida, Australia Sur, 1998.

378 CRUZ-ALEIXO, A.S.; et al. Scaling Relationships Among Heart Rate,
379 Electrocardiography Parameters, and Body Weight. *Topics in Compan. An. Med.*,
380 v.32, n.2, p.66-71, 2017.

381 DALACQUA, M.; BARROS, M. D. Feromônios humanos. *Arquivos médicos dos*
382 *Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, v.
383 51, n. 1, p. 27–31, 2006.

384 FALEWEE, C.; GAULTIER, E.; LAFONT, C.; BOUGRAT, L.; PAGEAT, P. Effect of a
385 synthetic equine maternal pheromone during a controlled fear-eliciting situation.
386 *Applied Animal Behaviour Science*, v. 101, n. 1–2, p. 144–153, 2006.

387 GONTIJO, L. D.; CASSOU, F.; MICHELOTTO JUNIOR, P. V.; ALVES, G. E. S.;
388 BRINGEL, B.; RIBEIRO, R. M.; LAGO, L. A. do; FALEIROS, R. R. Bem-estar em
389 equinos de policiamento em Curitiba/PR: indicadores clínicos, etológicos e ritmo

390 circadiano do cortisol. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1272–1276, 2014. Disponível
391 em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000701272&lng=pt&tlng=pt)
392 [84782014000701272&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000701272&lng=pt&tlng=pt)>.

393 HELESKI, C. R.; SHELLE, A. C.; NIELSEN, B. D.; ZANELLA, A. J. Influence of
394 housing on weanling horse behavior and subsequent welfare. **Applied Animal**
395 **Behaviour Science**, v. 78, n. 2–4, p. 291–302, 2002.

396 IBARRA-SORIA, X.; LEVITIN, M. O.; LOGAN, D. W. The genomic basis of
397 vomeronasal-mediated behaviour. **Mammalian Genome**, v. 25, n. 1–2, p. 75–86,
398 2014.

399 JOUHANNEAU, M.; SCHAAL, B.; COUREAUD, G. Mammary pheromone-induced
400 odour learning influences sucking behaviour and milk intake in the newborn rabbit.
401 **Animal Behaviour**, v. 111, p. 1–11, 2016.

402 KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. Clinical biochemistry of domestic
403 animals. 6.ed. New York: **Academic Press**, 2008. 916p.

404 LOGAN, D. W. The complexity of pheromone-mediated behaviour in mammals.
405 **Current Opinion in Behavioral Sciences**, v. 2, p. 96–101, 2015. Disponível em:
406 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cobeha.2014.10.011>>.

407 MAIA, A. P. D. A.; SARUBBI, J.; MEDEIROS, B. B. L.; MOURA, D. J. De.
408 Enriquecimento Ambiental Como Medida Para O Bem-Estar Positivo De Suínos.
409 **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 14, n. 14, p.
410 2862–2877, 2013. Disponível em: <[http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-](http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/reget/article/view/10746)
411 [2.2.2/index.php/reget/article/view/10746](http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/reget/article/view/10746)>.

412 MASON, G.; MENDEL, M. Why is there no simple way for measuring animal welfare?
413 **Animal Welfare**, v.2, n.4, p. 301-319, 1993.

414 MENDES, D. A.; NASCIMENTO, T. **Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia**
415 **do Exercício**. p. 171–175, 2009.

416 MENGOLI, M.; PAGEAT, P.; LAFONT-LECUELLE, C.; MONNERET, P.;
417 GIACALONE, A.; SIGHIERI, C.; COZZI, A. Influence of emotional balance during a

418 learning and recall test in horses (*Equus caballus*). **Behavioural Processes**, v. 106,
419 p. 141–150, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.beproc.2014.05.004>>.

420 PAGEAT, P. Response to Dodman, Wrubel & Cottam: Effect of a synthetic equine
421 maternal pheromone during a controlled fear-eliciting situation: A critique on Falewee
422 (January 2006). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 109, n. 1, p. 88–93, 2008.

423 SAMPAIO, B.F.B., SHIROMA, M.Y.M., BERTOZZO, B.R., COSTA E SILVA, E.V.,
424 ZÚCCARI, C.E.S.N., Equilíbrio do casco eqüino. REDVET. **Revista Electrónica de**
425 **Veterinaria**. 2014. Acesso em: 24 de junho de 2018. Disponível em:
426 <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63637992004>>

427 STOWERS, L.; KUO, T. H. Mammalian pheromones: Emerging properties and
428 mechanisms of detection. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 34, p. 103–109,
429 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2015.02.005>>.

430 VISSER, E. K., ELLIS, A. D.; VAN REENEN, C. G. The effect of two different housing
431 conditions on the welfare of young horses stabled for the first time. **Applied Animal**
432 **Behaviour Science**, v.114, p.521-533, 2008.

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

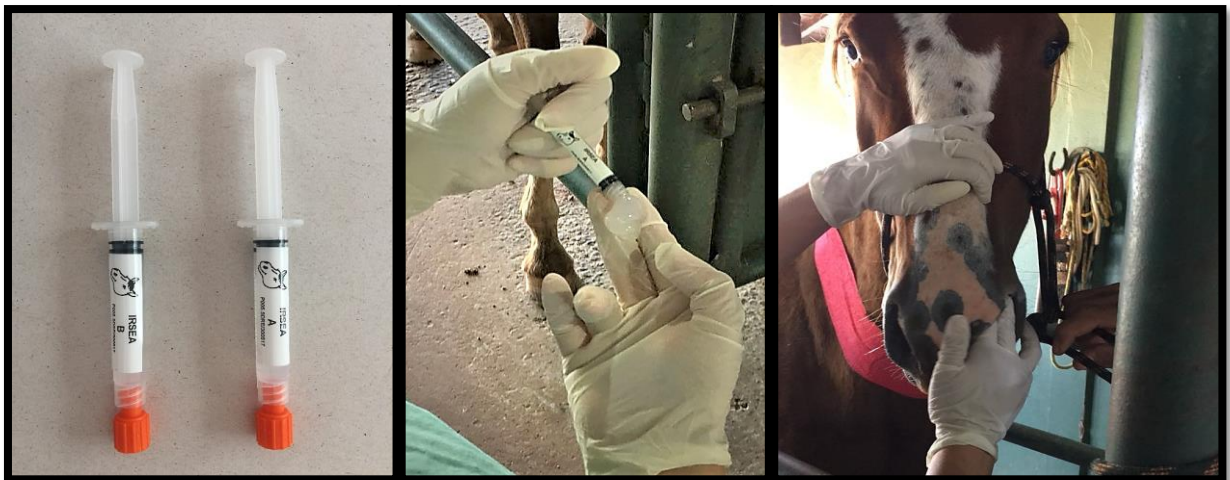
443

444

445 Chart 1. Time-domain HRV indexes

Index	Unit	Definition
NN	Ms	Mean of all RR intervals
SDNN	Ms	Standard deviation of all RR intervals
SDNNi	Ms	Mean of the standard deviations of RR intervals calculated over 5-second segments
SDANN	Ms	Standard deviation of the average RR intervals calculated over 5-second segments
RMSSD	Ms	Square root of the mean of the squares of the successive differences between adjacent RR intervals
pNN50	%	Proportion of successive differences between RR intervals that differ by more than 50 ms

446



447

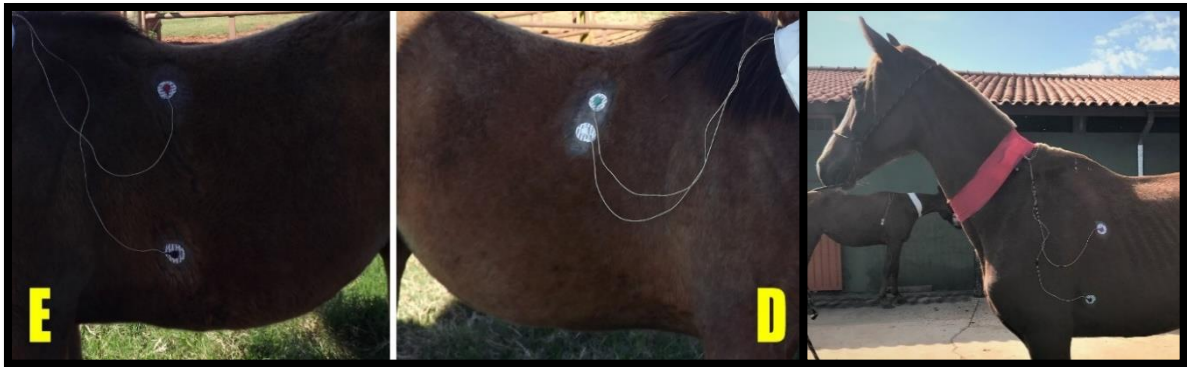
448 Figure 3. Identified syringes (A e B), the product being prepared and application by
449 the examiner in the outer edges of the animal's nostril.

450



451
452
453

Figure 4. Holter Equipment – Cables, electrodes, SD Card and protective cover.



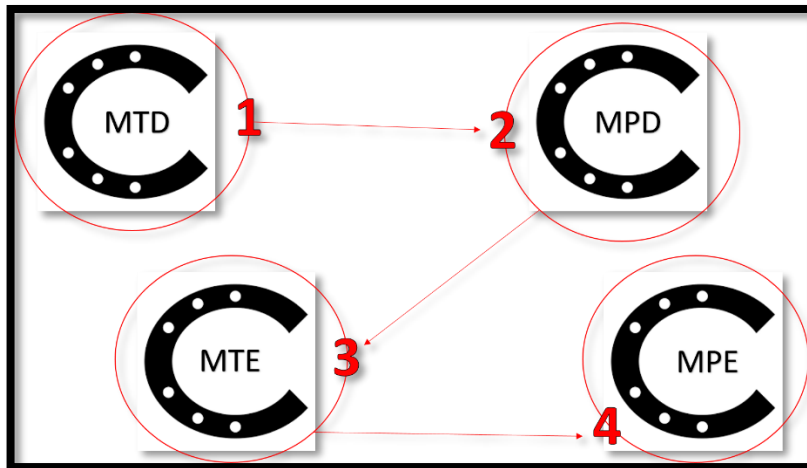
454
455
456
457

Figure 5. Position of the electrodes in the animal left (E) and right (D) sides; Holter device attached to the animal's neck.



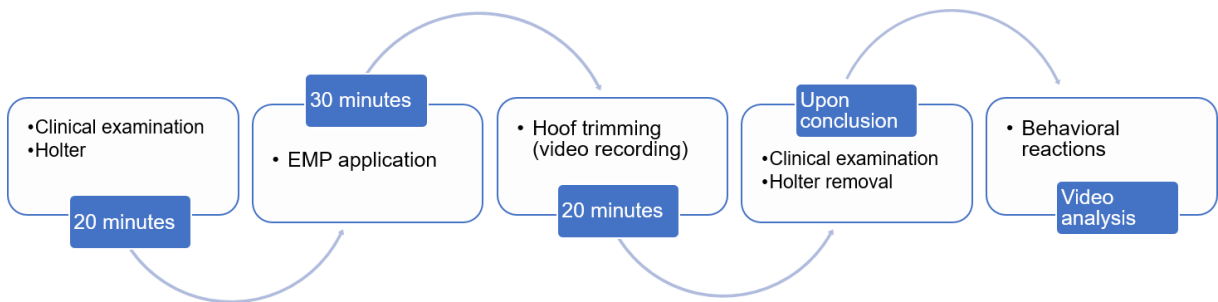
458
459
460

Figure 6. Equipment used in the hoof trimming procedure (pincer, rasp and hoof knife) and trimming being conducted.



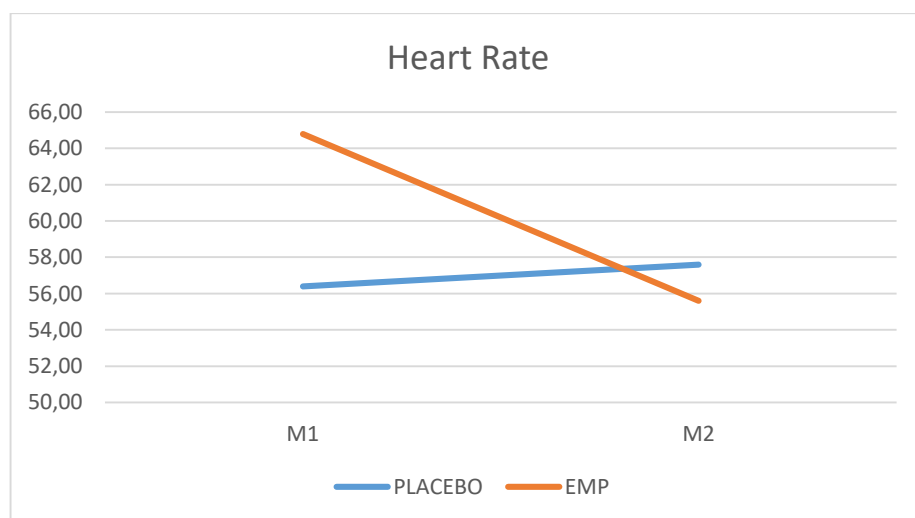
461
462
463
464
465

Figure 7. Sequence established for the hoof trimming procedure: (1) Right thoracic limb (MTD); (2) Right pelvic limb (MPD); (3) Left thoracic limb (MTE); (4) Left pelvic limb (MPE).



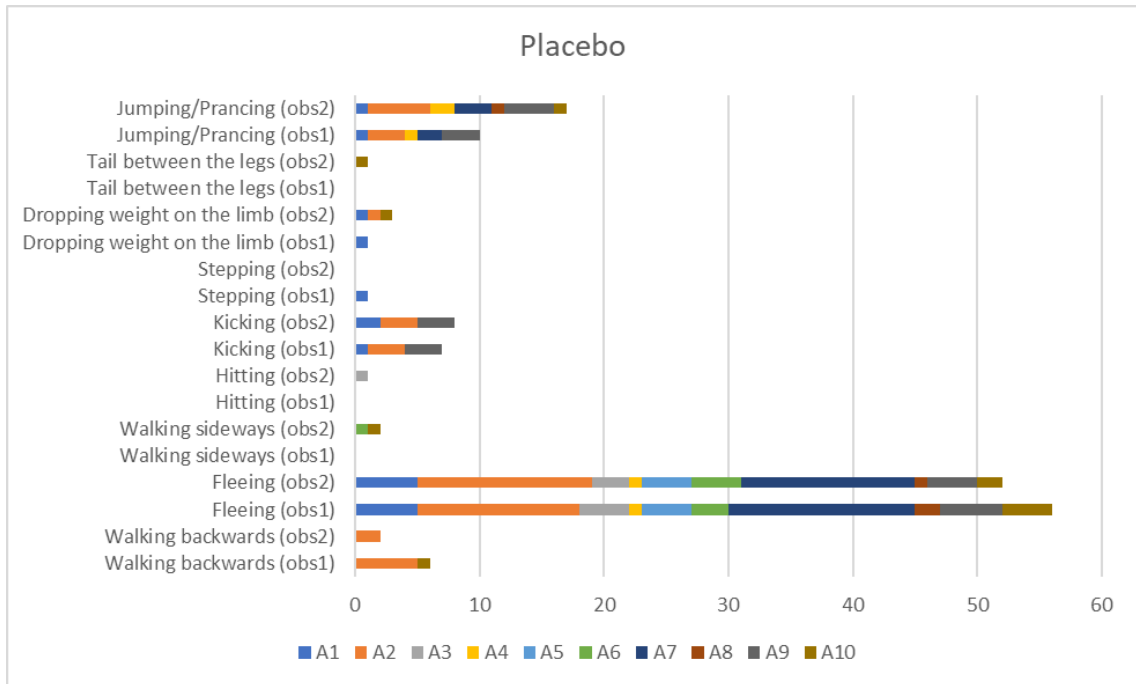
466
467
468

Figure 8. Overview of the experiment sequence for the study.



469
470
471
472

Figure 9. Behavior of the HR in Placebo and EMP groups before (M1) and after (M2) the hoof trimming procedure.



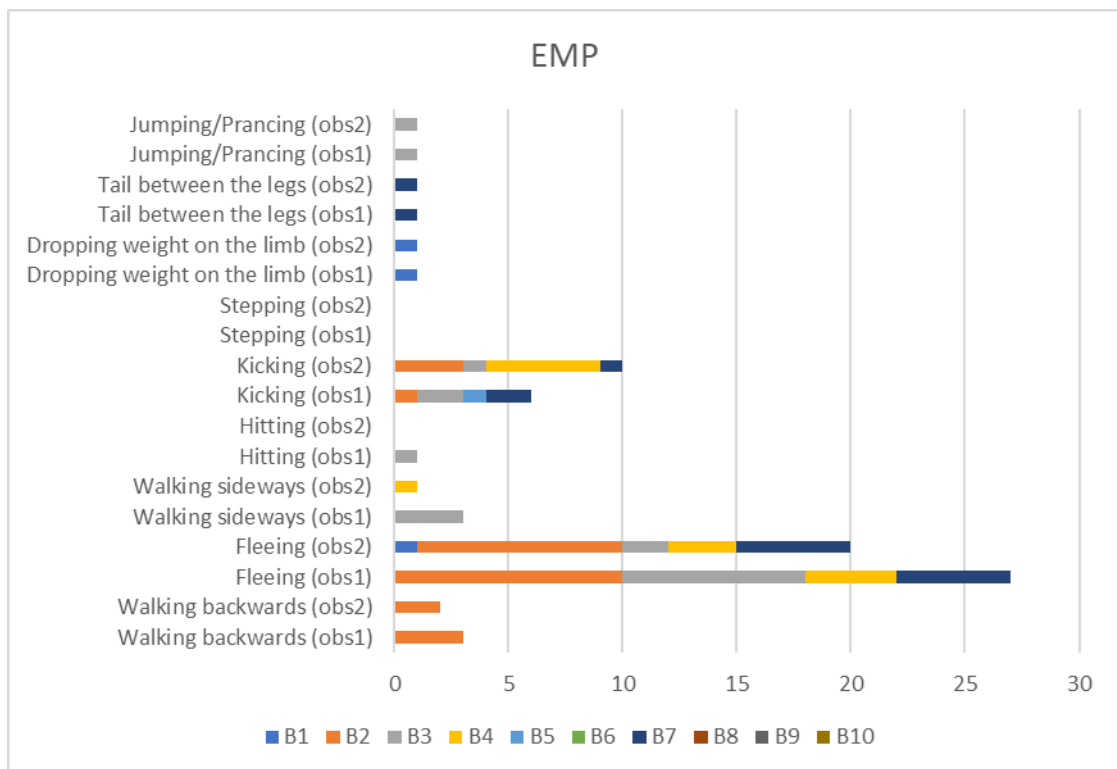
473

474

Figure 10. Quantification of the behavioral reactions given by the animals in the Placebo group as registered by Observer 1 (Obs1) and Observer 2 (Obs2).

475

476



477

478

Figure 11. Quantification of the behavioral reactions given by the animals in the EMP group as registered by Observer 1 (Obs1) and Observer 2 (Obs2).

479

480

481 Table 1. Mean (standard deviation) and p values for HR, RR, and Blood sugar level
 482 measurements obtained through clinical examination of equines undergoing hoof
 483 trimming with previous treatment with EMP and placebo.

Variable	Placebo	EMP	P Value
HR M1	56.40 (12.99)	64.80 (14.34)	0.187
HR M2	57.60 (16.78)	55.60 (14.78)	0.781
HR_dif_M2-1	1.20	-9.20	0.211
RR M1	31.20 (11.12)	31.60 (9.13)	0.931
RR M2	34.00 (7.36)	36.40 (14.87)	0.655
RR_dif_M2-1	2.80	4.80	0.777
Blood Sugar M1	99.60 (14.65)	102.90 (14.93)	0.624
Blood Sugar M2	99.70 (15.17)	95.00 (11.04)	0.438
Blood Sugar _dif_M2-1	0.10	-7.90	0.255

484 HR: heart rate; RR: respiratory rate. Comparisons between the groups through the t-test for
 485 independent samples.

486

487

488 Table 2. Mean (standard deviation) and p values for Minimum HR, Average HR and
 489 Maximum HR obtained through Holter examination of equines undergoing hoof
 490 trimming with previous treatment with EMP and placebo.

Variable	Placebo	EMP	P Value
Min HR	45.00 (10.28)	41.20 (7.89)	0.366
Avg HR	63.60 (25.16)	64.80 (22.89)	0.912
Max HR	112.40 (31.44)	122.30 (47.60)	0.590

491 Min HR: minimum heart rate; Avg HR: average heart rate; Max HR: maximum heart rate. Comparisons between
 492 the groups through the t-test for independent samples.

493

494

495

496

497

498

499

500

501

502 Table 3. Heart rate variability indexes (mean \pm standard deviation) obtained through
 503 Holter examination in the EMP and Placebo groups before (M1), during (M2) and after
 504 (M3) hoof trimming.

Parameter	EMP Group	Placebo	P Value
NN (ms)_M1	752.26 \pm 192.50	740.89 \pm 262.67	0.921
NN (ms)_M2	859.03 \pm 290.11	721.75 \pm 196.08	0.277
NN (ms)_M3	731.12 \pm 240.47	751.73 \pm 427.94	0.918
SDNN (ms)_M1	207.32 \pm 110.76)	184.82 \pm 63.68	0.623
SDNN (ms)_M2	247.97 \pm 142.43	229.98 \pm 123.86	0.786
SDNN (ms)_M3	155.81 \pm 122.59	177.47 \pm 107.52	0.731
RMSSD (ms)_M1	260.90 \pm 210.56	171.15 \pm 129.27	0.322
RMSSD (ms)_M2	204.66 \pm 148.19	237.15 \pm 229.24	0.730
RMSSD (ms)_M3	237.13 \pm 243.03	158.32 \pm 151.32	0.449
PNN50_M1	56.67 \pm 32.42	44.04 \pm 25.66	0.347
PNN50_M2	50.08 \pm 21.33	42.82 \pm 29.19	0.533
PNN50_M3	49.63 \pm 36.76	39.87 \pm 32.08	0.535

505 NN: Interval between two consecutive R waves, or mean NN for all the recording; SDNN: standard deviation of all
 506 normal RR intervals in the examination; rMSSD: Square root of the mean of the squares of the successive
 507 differences between adjacent normal RR intervals in the entire examination; pNN50: proportion of differences
 508 exceeding 50 ms between adjacent normal RR intervals in a 24-hour examination. Statistical analysis: Comparisons
 509 between the groups through the t-test for independent samples.

510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520

CAPÍTULO III

DISCUSSÃO GERAL

Embora não tenhamos encontrado diferenças significativas, os parâmetros avaliados tiveram uma tendência a serem diferentes no grupo tratado com FME e também foram detectadas durante a realização prática mudanças no comportamento dos animais deste grupo.

A FC dos equinos dos grupos FME e placebo iniciou-se com valores acima dos limites de referência descritos para a espécie no exame clínico realizado em repouso, antes da manipulação para colocar o gravador de Holter e realizar o casqueamento, indicando assim que estes já se encontravam em estado de alerta, justificado pelo simples fato de terem sido contidos. Quando os animais estão inseguros em determinada situação, estes podem sofrer modificações fisiológicas destacando-se assim a importância de estudar este parâmetro. A FC é uma expressão da ativação emocional (VISSER et al., 2002).

Apesar de não ter sido significativo, a FC (obtida ao exame clínico) apresentou-se mais elevada no momento M1 ($64,80 \pm 14,34$) demonstrando posteriormente uma diminuição no M2 ($55,60 \pm 14,78$), com uma diferença de $-9,20$ batimentos por minuto. Há relatos de que além de seis bpm acima da frequência de repouso pode-se caracterizar algum tipo de estresse (CRAIG; NUNAN, 1998). Isso indica que o FME foi capaz de auxiliar o processo de adaptação fisiológica ao qual os animais foram submetidos. Já o grupo placebo se comportou de maneira inversa. Um aumento na FC resulta de atividade vagal reduzida e aumento na atividade simpática ou, em algumas vezes, de uma combinação de mudanças na atividade dos dois ramos do SNA concomitantemente (VON BORELL et al., 2007).

Quando se comparou a glicemia do grupo placebo e do grupo FME nos momentos M1 e M2 as diferenças estatísticas não foram significativas, apesar de que assim como na FC o grupo FME apresentou no pré-casqueamento valores mais altos do que o pós-casqueamento, ou seja, uma diferença de $-7,90$ mg/dL (Tabela 1). No grupo placebo, o M1 e o M2 mantiveram-se semelhantes.

A glicemia no estresse correlaciona-se ao aumento do cortisol devido ao fato de que quando ocorre um estímulo estressor o hipotálamo sintetiza o hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que induz a glândula hipófise a produzir o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), o qual se desloca através da corrente sanguínea até as glândulas adrenais e estimulam a síntese do cortisol, conhecido como hormônio do estresse. Simultaneamente ocorre ativação do SNS, levando à liberação de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) e conseqüentemente elevação da glicogenólise (MENDES; NASCIMENTO, 2009).

Os índices obtidos através do Holter, demonstraram que a FC mínima, média e máxima apresentaram-se elevadas em ambos os grupos, porém em alguns casos, a FC pode aumentar rapidamente para mais de 100bpm, principalmente em casos envolvendo medo repentino, excitação ou pré-exercício (CLAYTON, 1991; EVANS, 1994).

Os demais índices refletem a variabilidade na atividade cardíaca, e são influenciados pela atividade simpática e parassimpática (VON BORELL et al., 2007). Os índices SDNN é obtido a partir de registros de longa duração e representa a atividades simpática e parassimpática, porém não permite distinguir quando as alterações da VFC são devidas ao aumento do tônus simpático ou à remoção do tônus vagal. Já os índices RMSSD e pNN50 representam a atividade parassimpática, pois são encontrados a partir da análise de intervalos RR adjacentes (Vanderlei et al., 2009). Uma alta variabilidade na FC é indício de boa adaptação, caracterizando um indivíduo saudável, com mecanismos autonômicos eficientes, enquanto que baixa variabilidade é frequentemente um indicador de adaptação anormal e insuficiente do SNA, implicando a presença de mau funcionamento fisiológico no indivíduo (ABREU, 2012).

Devido a falha na gravação dos dados de quatro animais durante o procedimento a análise estatística acabou sendo prejudicada já que o número de amostras interpretadas para este exame também pode ter sido um fator relevante. Portanto a avaliação de uma resposta ao estresse é melhor realizada quando se associa as medidas fisiológicas e comportamento (BROOM, 1991; MASON E MENDLE, 1993).

Os observadores que analisaram os vídeos demonstraram que houve um número muito maior de reatividade nos animais do grupo placebo. Além disso, pode-se notar que ambos os grupos apresentaram como principal reação diante desta situação o comportamento de fuga assim como pode ser observado nas figuras 10 e 11.

Na prática de casqueamento, observou-se que dois animais do grupo FME, que apresentavam histórico de alta reatividade diante de pessoas, manifestando reações comportamentais exacerbadas (coices) ao sentirem-se amedrontados, foram manuseados tranquilamente durante o experimento.

O equino possui uma habilidade consideradamente alta para aprendizagem e isso influencia fortemente os primeiros manejos ou treinamentos. Ou seja, quanto mais condicionado o animal estiver para tal situação, mais fácil será a manipulação, desde que este primeiro ato não tenha lhe gerado medo, pois em situações futuras semelhantes, podem suscitar respostas negativas. No entanto, a aprendizagem de forma positiva, facilita o entendimento gerando comportamentos e reações positivas durante os próximos manejos (MENGOLI et al., 2014). Em nosso estudo, os animais utilizados eram jovens e sem doma, sendo que a maioria aceitava somente o cabresto. Levando-se em consideração o fato de que os animais nunca tinham sido submetidos ao casqueamento e, portanto, não passaram pelo processo de aprendizagem a tendência é de que, o nível de reatividade fosse elevado em todos os animais, pois o procedimento seria interpretado como uma ameaça, principalmente no momento da contenção do animal.

Em estudo envolvendo equinos submetidos a uma situação indutora de medo sob efeito do FME utilizou-se o frequencímetro (Polar® Horse Trainer Advanced TM). Os resultados foram semelhantes ao nosso estudo no que diz respeito a VFC, pois também não foram encontradas diferenças estatísticas durante a utilização do FME. Os autores também relataram a perda de dados da FC devido à falha na gravação, conforme observado no presente estudo, prejudicando, por conseguinte, a análise. Entretanto, segundo os autores, a FC média e a FC máxima se mantiveram mais baixas durante o estudo no grupo tratado com FME. Além disso, obtiveram sucesso nas análises relacionadas ao desempenho e comportamento, comprovando que o FME se mostrou viável para ser utilizado em tarefas específicas que provocam medo e ansiedade.

CONCLUSÃO GERAL

- O FME demonstrou ser uma ferramenta útil para melhorar a relação homem e animal auxiliando positivamente no manejo de casqueamento em equinos sem experiência prévia e altamente reativos;
- Apesar da estatística não ser significativa para os parâmetros avaliados, pode-se perceber na experimentação prática alterações marcantes no comportamento, tornando possível identificar qual dos dois grupos recebeu o tratamento com FME;
- A falha na gravação de alguns exames do Holter e o número de animais envolvidos foram fatores relevantes na pesquisa;
- Estudos devem continuar com intuito de favorecer a utilização do FME em outras atividades envolvendo equinos.

NORMAS DA REVISTA

Journal of Veterinary Behavior

Disponível em: <https://www.journalvetbehavior.com/content/authorinfo>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.C. Variabilidade da Frequência Cardíaca como marcador funcional do desenvolvimento. *Journal of Human Growth and Development*, v.22, n.3, p.279-282, 2012.

AUBERT, A. E.; SEPS, B.; BECKERS, F. Heart Rate Variability in Athletes. *Sports Medicine*, v.33, n.12, p.889-919, 2003.

BEHR, G.A. *Exposição curta a feromônios de ratos machos diminui a ansiedade e atividade locomotor – exploratória e modula o perfil redox do sistema nervosa central e trato de fêmeas virgens*. 2009. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BERLINER, D.L.; JENNINGS-WHITE, C.; LAYKER R.M. The human skin: fragrances and pheromones: A review. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.39(4B), p.671-679, 1991.

BERGER, J. M.; SPIER, S. J.; DAVIES, R.; GARDNER, I. A.; LEUTENEGGER, C. M.; BAIN, M. Behavioral and physiological responses of weaned foalstreated with equine appeasing pheromone: A double-blinded, placebo-controlled, randomized trial. *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, v. 8, n. 4, p. 265–277, 2013.

BIRD, J. *Cuidado natural del caballo: Un enfoque natural para su óptimo estado de salud, desarrollo y rendimiento*. Barcelona: Acanto, 2004, 206p.

BITTENCOURT M.I.; BARBOSA P.R.B.; et al. Avaliação da função autonômica na cardiomiopatia hipertrófica. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v.85, n.6, p.388-396, 2005.

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

BRENNAS, M.J.; SILVA, C.S. Feromonas: comunicação por meios químicos. *Revista da Faculdade de Ciência e Tecnologia*, v.5, p.54-61, 2008.

BROOM, D.M. Animal welfare: concepts and measurement. *Journal of Animal Science*, v.69, n.10, p.4167-4175, 1991.

BROOM, D. M.; FRASER, A. F. *Comportamento e bem-estar de animais domésticos*. 4.ed. Barueri: Manole, 2010, 438p.

CALVERT, C.A. Heart rate variability: advances in cardiovascular diagnostics and therapy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.28, n.6, p.1409-1427, 1998.

CASEY, R. A. Clinical problems associated with intensive management of performance horses. In: WARAN, N. *The Welfare of Horses*. Kluwer Academic Publishers: Boston, London, 2002. 1.ed, p.225.

CINTRA, A.G. *O cavalo: Características, Manejo e Alimentação*. 1.ed. São Paulo: Roca, 2011. 384p.

CINTRA, A.G. Considerations Equine Behavior. *Braslian Journal of Equine*. 2014. Disponível em: <<https://meiorural.com.br/andrecintra/2016/08/07/consideracoes-sobre-comportamento-equino-revisao-bibliografica/>>. Acesso em: 07 de abril de 2018.

COHN B.A. In search of human skin pheromones. A review. *Archives of Dermatology*, v.130, p.1048-1051,1994.

COOPER, J.; MASON, G. J. The identification of abnormal behaviour and behavioural problems in stabled horses and their relationship to horse welfare: a comparative review. *Equine Veterinary Journal*, v.30, p.5-9, 1998.

COWLEY J.J.; BROOKSBANK, B.W. Human exposure to putative pheromones and changes in aspects of social behaviour. A review. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.39(4B) p.647-59, 1991.

COZZI, A.; MONNERET, P.; ARTICLAUX, F.; BOUGRAT, L.; PAGEAT, P. The role of maternal appeasing semiochemical during transport : implications for animal welfare. In: ANNUAL CONFERENCE OF ATA ANIMAL TRANSPORTATION ASSOCIATION, 38, 2011. v. 101, n. 3, p. 84.

CROWELL-DAVIS, S.; HOUP, K. A. The ontogeny of flehmen in horses. *Animal Behaviour*, v. 33, n. 3, p. 739–745, 1985.

CROWELL-DAVIS S.L.; HOUP K.A.; CARNEVALE J. Feeding and drinking behavior of mares and foals with free access to pasture and water. *Journal of Animal Science*, v.60, n.4, p.883-889, 1985.

CRUZ-ALEIXO, A.S.; et al. Scaling Relationships Among Heart Rate, Electrocardiography Parameters, and Body Weight. *Topics in Companion Animal Medicine*, v.32, n.2, p.66-71, 2017.

DALACQUA, M.; BARROS, M. D. Feromônios humanos. *Arquivos médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, v. 51, n. 1, p. 27–31, 2006.

DIAS, C.G.A.; SILVA, L.D.M.; MATTOS, M.R.F. Papel do olfato no estabelecimento do vínculo materno-filial em mamíferos. *Ciência Animal*, 18(02), p.57-66, 2008.

DUKES, H.H.; REECE, W.O. *Fisiologia dos animais domésticos*. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, 926p.

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

FALEWEE, C.; GAULTIER, E.; LAFONT, C.; BOUGRAT, L.; PAGEAT, P. Effect of a synthetic equine maternal pheromone during a controlled fear-eliciting situation. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 101, n. 1–2, p. 144–153, 2006.

FRADSON, R. D.; WILKE, W. L.; FAILS, A. D. *Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda*. 6.ed. Rio de Janeiro-RJ: Guanabara Koogan, 2005. 454p.

FUREIX, C.; PAGÈS, M.; BON, R.; et al. A preliminary study of the effects of handling type on horse' emotional reactivity and the human-horse relationship. *Behavioural Processes*, v.82, n.2, p. 202-210, 2009.

GAULTIER, E.; BONNAFOUS, L.; BOUGRAT, L.; LAFONT, C.; PAGEAT, P. Comparison of the efficacy of a synthetic dog-appeasing pheromone with clomipramine for the treatment of separation-related disorders in dogs. *Veterinary Record*, v. 156, n. 17, p. 533–538, 2005.

GODOY, M.F.; TAKAKURA, I.T.; CORREA, P.R.; Relevância da análise do comportamento dinâmico não-linear (Teoria do Caos) como elemento prognóstico de morbidade e mortalidade em pacientes submetidos à cirurgia de revascularização miocárdica. *Arquivos de Ciências da Saúde*, v.12, n.4, p.167-171, 2005.

GOODWIN, D. The importance of ethology in understanding the behaviour of the horse. *Equine Veterinary Journal*, v. 31, p. 15-19, 1999.

GONTIJO, L. D.; CASSOU, F.; MICHELOTTO JUNIOR, P. V.; ALVES, G. E. S.; BRINGEL, B.; RIBEIRO, R. M.; LAGO, L. A. do; FALEIROS, R. R. Bem-estar em equinos de policiamento em Curitiba/PR: indicadores clínicos, etológicos e ritmo circadiano do cortisol. *Ciência Rural*, v. 44, n. 7, p. 1272–1276, 2014.

HELESKI, C. R.; SHELLE, A. C.; NIELSEN, B. D.; ZANELLA, A. J. Influence of housing on weanling horse behavior and subsequent welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 78, n. 2–4, p. 291–302, 2002.

HENZEL, M. S. *O enriquecimento ambiental no bem-estar de cães e gatos*. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

IBARRA-SORIA, X.; LEVITIN, M. O.; LOGAN, D. W. The genomic basis of vomeronasal-mediated behaviour. *Mammalian Genome*, v. 25, n. 1–2, p. 75–86, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Produção da pecuária municipal. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>> Acesso em: 11 de abril de 2018.

JENSEN-URSTAD, K.; et al. Pronounced resting bradycardia in male elite runners is associated with high heart rate variability. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, v.7, n.5, p.274-278, 1997.

KUWAHARA, M.; TSUJINO, Y.; TSUBONE, H.; et al. Effects of pair housing on diurnal rhythms of heart rate and heart rate variability in miniature swine. *Experimental Animals*, v.53, n.4, p.303-309, 2004.

LOGAN, D. W. The complexity of pheromone-mediated behaviour in mammals. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, v. 2, p. 96–101, 2015.

LOPES, P.F.F.; OLIVEIRA, M.I.B.; ANDRÉ, S.M.S.; et al. Aplicabilidade Clínica da Variabilidade da Frequência Cardíaca. *Revista Neurociências*, v.21, n.4, p.600-603, 2013.

LOTUFO, P.A.; VALIENGO, L.; BENSENOR, I.M.; BRUNONI, A.R. A systematic review and meta-analysis of heart rate variability in epilepsy and antiepileptic drugs. *Epilepsia*. v.53, n.2, p.272–282, 2012.

MAIA, A. P. D. A.; SARUBBI, J.; MEDEIROS, B. B. L.; MOURA, D. J. D. Enriquecimento ambiental como medida para o bem-estar positivo de suínos. *Revista*

Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, v. 14, n. 14, p. 2862–2877, 2013.

MASON, G.; MENDEL, M. Why is there no simple way for measuring animal welfare? *Animal Welfare*, v.2, n.4, p. 301-319, 1993.

MENGOLI, M.; PAGEAT, P.; LAFONT-LECUELLE, C.; MONNERET, P.; GIACALONE, A.; SIGHIERI, C.; COZZI, A. Influence of emotional balance during a learning and recall test in horses (*Equus caballus*). *Behavioural Processes*, v. 106, p. 141–150, 2014.

MOLENTO, C. F. M. Senciência animal. *Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná - CRMV-PR*, 2006. Disponível em: <<http://www.labea.ufpr.br/PUBLICACOES/Arquivos/Pginas%20Iniciais%20%20Senciencia.pdf>> Acesso em: 07 de abril de 2018.

MOBERG, G.P. *Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare*. 1.ed. New York: CABI, 2000. 377p.

NETO, A.R. *Fisiologia Cardiovascular*. Cap.6 p.35-45, 2011. Disponível em: <www.cepeti.com.br/bibliografia_ligami2011.pdf>. Acesso em: 12 de abril de 2018.

NOVAIS, L.D.; SAKABE, D.I.; TAJAHASHI, A.C.M.; et al. Avaliação da variabilidade da frequência cardíaca em repouso de homens saudáveis sedentários e de hipertensos e coronariopatas em treinamento físico. *Revista Brasileira De Fisioterapia*, v.8, n.3, p.207-213, 2004.

PASCON, J.P. *Estudo da variabilidade da frequência cardíaca em cães*. 2009. 112f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

PROCTOR, H. Animal Sentience: Where Are We and Where Are We Heading? *Animals*, v.2, n.4, p.628-639, 2012.

PUMPRLA, J.; et al. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. *International Journal Cardiology*, v.84, n.1, p.1-14, 2002.

ROQUE, J.M.A. *Variabilidade da frequência cardíaca*. 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências do Desporto e Educação Física da Universidade de Coimbra, Coimbra.

SAMPAIO, B.F.B., SHIROMA, M.Y.M., BERTOZZO, B.R., COSTA E SILVA, E.V., ZÚCCARI, C.E.S.N., Equilíbrio do casco equino. REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 2014.

SCHWAB, J.O.; EICHNER, G.; SCHMITTJ, H.; SCHRICKEL, A.; YANG, O.; BALTA, B.; LÜDERITZ, T.; LEWALTER, Z. Heart rate variability in patients suffering from structural heart disease and decreased AV-nodal conduction capacity. *Zeitschrift für Kardiologie*, v.93, 2004.

SCHNEIDER, N.Y.; FLETCHER, T.P.; SHAW, G.; RENFREE, M.B. The vomeronasal organ of the tammar wallaby. *Journal of anatomy*, v.213, p.93-105, 2008.

SMYTHE, R.H. *A psique do cavalo*. 1.ed. Espanha: International Data, S.A., 1990. 141p.

THORNE, J. B.; GOODWIN, D.; KENNEDY, M. J.; et al. Foraging enrichment for individually housed horses: Practicality and effects on behaviour. *Applied Animal Behaviour Science*, v.94, p.149-164, 2005.

VAGLIO, S. Chemical communication and mother-infant recognition. *Communicative & Integrative Biology*, v.2, n.3, p.279-281, 2009.

VILELA, E.F.; DELLA LUCIA, T.M.C. *Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas*. 1.ed. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa, 1987. 155p.

VISSER, E. K., ELLIS, A. D.; VAN REENEN, C. G. The effect of two different housing conditions on the welfare of young horses stabled for the first time. *Applied Animal Behaviour Science*, v.114, p.521-533, 2008.

ZHOU, F. et al. Vasopressors in septic shock: a systematic review and network meta-analysis. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, vol.11, 2015.