

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE, BEM-ESTAR E PRODUÇÃO
ANIMAL SUSTENTÁVEL NA FRONTEIRA SUL

TAINÁ MINUZZO

EFEITOS CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS DO FEROMÔNIO
ANÁLOGO AO ODOR MATERNO EM CÃES NO AMBIENTE HOSPITALAR

REALEZA

2023

TAINÁ MINUZZO

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS DO FEROMÔNIO
ANÁLOGO AO ODOR MATERNO EM CÃES NO AMBIENTE HOSPITALAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Tatiana Champion

REALEZA

2023

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Minuzzo, Tainá

Efeitos cardiovasculares e comportamentais do feromônio análogo ao odor materno em cães no ambiente hospitalar / Tainá Minuzzo, Juliana Schmitz Bascherotto. -- 2023.

41 f.:il.

Orientadora: Dra Tatiana Champion

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável Na Fronteira Sul, Realeza, PR, 2023.

1. Bem-Estar. 2. Estresse. 3. Feromônio Apaziguador de Cães. 4. Sistema Nervoso Autônomo. 5. Variabilidade da Frequência Cardíaca. I. Bascherotto, Juliana Schmitz II. Champion, Tatiana, orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

TAINÁ MINUZZO

**EFEITOS CARDIOVASCULARES E COMPORTAMENTAIS DO FEROMÔNIO ANÁLOGO
AO ODOR MATERNO EM CÃES NO AMBIENTE HOSPITALAR**

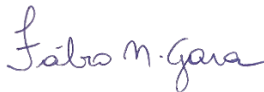
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 05 de abril de 2023.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dr^a. Tatiana Champion – UFFS
Orientadora



Prof^o. Dr. Fabio Nelson Gava – UEL
Avaliador



Prof^o. Dr. João Paulo da Exaltação Pascon - UNIPAMPA
Avaliador

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Aldacir e Roseli, à minha irmã, Maiara,
pela paciência, amor e por nunca medirem esforços
em prol do meu bem. Vocês são os principais responsáveis
por mais esse sonho que se concretiza em minha vida.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que me concede todos os dias o dom da vida, me dando estímulo e perseverança para atingir todos os meus objetivos.

Aos meus pais, **Aldacir e Roseli**, por todo o suporte emocional e financeiro necessário desde o dia em que escolhi sair de casa para correr atrás do meu sonho. Vocês são minha base, meus exemplos de hombridade e amor.

À minha irmã, **Maiara**, por todo o incentivo, amor e preocupação destinada a mim. Mesmo distante fisicamente sempre esteve torcendo por mim. Sou imensamente grata por tê-la em minha vida.

Ao meu namorado, **Esmair Raphael**, por todo o apoio, carinho e compressão ao longo dessa jornada, com você tudo se tornou mais fácil. Obrigada por percorrer comigo essa trajetória.

À minha orientadora, **Tatiana Champion**, por sempre acreditar em mim, encorajando-me a me aprofundar cada vez mais nessa área tão apaixonante. Sinto-me honrada por ter sido sua orientada na pós-graduação.

A todos os **tutores** e aos **cães** que participaram desse estudo, por toda a paciência e dedicação em prol do experimento.

Aos meus **amigos**, que independente da distância sempre estiveram comigo.

A vocês, sou infinitamente grata!

*“Até que você ame um animal, uma
parte de sua alma permanece
adormecida.”*

(Anatole França)

RESUMO

O estresse observado em cães hospitalizados traz efeitos deletérios e o feromônio análogo ao odor materno tem sido utilizado nesse propósito. O objetivo do estudo foi analisar se o feromônio análogo ao odor materno interfere nos parâmetros físicos, cardiovasculares e comportamentais em cães hospitalizados. Foi realizado um estudo prospectivo, pareado, randomizado e cego, no qual dez cães hípidos foram submetidos a dois protocolos experimentais: feromônio e placebo. Os parâmetros avaliados no momento basal, seis, doze, vinte e vinte e quatro horas do início do estudo, foram: frequência cardíaca, frequência respiratória, pressão arterial sistólica e temperatura retal. Análises comportamentais, tempo de sono, variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo e frequências cardíacas mínimas, médias e máximas foram monitoradas ao longo das 24 horas de internação. Não se constataram diferenças nas frequências respiratórias e pressão arterial sistólica, embora apresentaram-se elevadas nos dois tratamentos empregados. A frequência cardíaca máxima do grupo placebo no momento T0 (193 ± 23 bpm) foi menor quando comparada aos momentos T6, T12, T20 (226 ± 13 bpm; 229 ± 16 bpm; 230 ± 19 bpm, respectivamente), demonstrando o estresse no ambiente hospitalar. As alterações encontradas em temperatura retal não trazem importância clínica, pois os valores se mantiveram dentro da normalidade para a espécie. Constatou-se maior frequência cardíaca média no momento T20 do grupo feromônio (120 ± 17 bpm) do que no grupo placebo (105 ± 14 bpm). Durante a monitorização do grupo placebo, observou-se maior frequência cardíaca mínima no momento T0 (82 ± 15 bpm), quando comparado aos momentos T6, T12, T20, T24 (51 ± 12 bpm; 51 ± 11 bpm; 50 ± 8 bpm; 59 ± 20 bpm, respectivamente). No momento T6, observou-se maior frequência cardíaca mínima no grupo feromônio (60 ± 17 bpm) do que no grupo placebo (51 ± 12 bpm). Embora tenham sido observadas flutuações nas frequências cardíacas médias e mínimas durante a monitorização, não se constataram valores clinicamente relevantes, uma vez que todos se encontravam também dentro da normalidade para a espécie. Não houve diferença nos parâmetros comportamentais analisados entre tratamentos. Não houve diferença no tempo de sono entre as substâncias. Não houve diferença na variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo entre as substâncias analisadas. A concordância interobservador foi positiva, a denotar análise com boa confiabilidade. A exposição ao feromônio análogo ao odor materno na apresentação de difusor, portanto, não promoveu alterações significativas em parâmetros fisiológicos, cardiovasculares e comportamentais relacionados à redução do estresse em cães hospitalizados.

Palavras-chave: Bem-Estar; Estresse; Feromônio Apaziguador de Cães; Sistema Nervoso Autônomo; Variabilidade da Frequência Cardíaca

ABSTRACT

The stress observed in hospitalized dogs causes deleterious effects and the pheromone analogous to maternal odor has been used for this purpose. The aim of the study was to analyze whether the pheromone analogous to maternal odor interferes with physical, cardiovascular and behavioral parameters in hospitalized dogs. A prospective, paired, randomized and blinded study was conducted, in which ten healthy dogs were submitted to two experimental protocols: pheromone and placebo. The parameters evaluated at baseline, six, twelve, twenty and twenty-four hours from the beginning of the study, were: heart rate, respiratory rate, systolic blood pressure and rectal temperature. Behavioral analyses, sleep time, heart rate variability in the time domain and minimum, mean and maximum heart rates were monitored throughout the 24 hours of hospitalization. There were no differences in respiratory rates and systolic blood pressure, although they were elevated in the two treatments used. The maximum heart rate of the placebo group at moment T0 (193 ± 23 bpm) was lower when compared to moments T6, T12, T20 (226 ± 13 bpm; 229 ± 16 bpm; 230 ± 19 bpm, respectively), demonstrating the stress in the hospital environment. The alterations found in rectal temperature do not bring clinical importance, because the values remained within normal limits for the species. A higher mean heart rate at time T20 in the pheromone group (120 ± 17 bpm) than in the placebo group (105 ± 14 bpm). During the placebo group monitoring, a higher minimum heart rate was observed at moment T0 (82 ± 15 bpm), when compared to moments T6, T12, T20, T24 (51 ± 12 bpm; 51 ± 11 bpm; 50 ± 8 bpm ; 59 ± 20 bpm, respectively). At T6, a higher minimum heart rate was observed in the pheromone group (60 ± 17 bpm) than in the placebo group (51 ± 12 bpm). Although fluctuations in mean and minimum heart rates were observed during monitoring, clinically relevant values were not found, since all were also within normal limits for the species. There was no difference in the behavioral parameters analyzed between treatments. There was no difference in sleep time between substances. There was no difference in heart rate variability in the time domain between the analyzed substances. Interobserver agreement was positive, denoting analysis with good reliability. Exposure to the pheromone analogous to maternal odor in the diffuser presentation, therefore, did not promote significant changes in physiological, cardiovascular and behavioral parameters related to stress reduction in hospitalized dogs.

Keywords: Wellness; Stress; Dog Appeasing Pheromone; Autonomic Nervous System; Heart Rate Variability

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. HIPÓTESES	9
3. OBJETIVOS	9
3.1 GERAL.....	9
3.2 ESPECÍFICOS	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	9
4.1 TRIAGEM.....	9
4.2 O ESTUDO	10
4.2.1 Avaliação experimental.....	14
4.2.1.1. Eletrocardiografia ambulatorial	14
4.2.1.2 Frequência respiratória.....	16
4.2.1.3 Temperatura retal	16
4.2.1.4 Pressão arterial sistólica	16
4.2.1.5 Comportamento.....	17
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	18
5. RESULTADOS	19
6. DISCUSSÃO	23
7. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28
ANEXO I – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	32
ANEXO II – Termo de Anuência para Uso de Materiais Biológicos	35
ANEXO III– Ficha de protocolo experimental	37

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, estudos têm demonstrado que estresse psicogênico agudo ou crônico desencadeia implicações importantes para a saúde de animais e pessoas. Cães hospitalizados podem sofrer de estresse em decorrência da exposição ao novo ambiente, submissão à procedimentos invasivos e principalmente, em resposta a separação do cuidador primário (HEKMAN; KARAS; SHARP, 2014).

A relevância clínica do estresse nesses animais ainda não está bem elucidada, embora Yuki *et al.*, (2019) observaram que cães com alto nível de cortisol nas primeiras 24 horas de internamento, tiveram menor sobrevida quando comparados a cães com níveis inferiores. Demonstrando desse modo, que o manejo do estresse já na admissão do paciente, é de extrema importância.

Contudo, há de se considerar a ausência de indicadores qualitativos e quantitativos universais de estresse e tampouco protocolos padronizados para prevenção e controle em pequenos animais. Face ao exposto, a análise comportamental associada avaliação de marcadores de estresse é a forma mais confiável para interpretar o estado psicológico do cão e definir o diagnóstico de estresse de forma mais acurada (LEFMAN; PRITTIE, 2019; KARTASHOVA *et al.*, 2021).

Os principais biomarcadores laboratoriais de estresse em cães são: cortisol (marcador mais popular), prolactina, imunoglobulina A secretória, ocitocina, catestatina e vasostatina salivar. Entretanto, há dificuldade em estabelecer os níveis de confiabilidade desses testes, uma vez que sofrem interferências de muitos fatores e não possuem valores de referência precisos (BURNARD *et al.*, 2017; SCHOBEL *et al.*, 2017; RIGHI *et al.*, 2019; GUTIÉRREZ *et al.*, 2019;).

Além da bioquímica sérica para mensuração de estresse, outros parâmetros fisiológicos são úteis no diagnóstico, como frequência cardíaca, que usualmente encontra-se alterada perante situações estressantes devido à ativação simpática. A atuação da noradrenalina nas fibras simpáticas cardíacas, as quais são responsáveis por ativar receptores β_1 no nodo sinoatrial e miocárdio, geram aumento da força contrátil (inotropismo positivo), assim como aumento da frequência de disparos e conseqüentemente da frequência cardíaca (cronotropismo positivo) (GOMART; ALLERTON; GOMMEREN, 2014; COSTANZO, 2015; EDWARDS *et al.*, 2022). No entanto, trabalhos têm demonstrado que fatores como postura e movimentação corporal tendem a interferir nesses valores, não sendo, portanto, um dado fidedigno para análise de

estresse quando utilizado isoladamente (MAROS; DÓKA; MIKLÓSI, 2008, PICCIONE, *et al.*, 2012).

Alterações na resistência vascular sistêmica também são visualizadas em virtude da ativação do sistema nervoso simpático, que resulta em estimulação de receptores α_1 na musculatura lisa dos vasos sanguíneos, promovendo vasoconstrição e aumento da pressão arterial sistólica (BRAGG *et al.*, 2015; COSTANZO, 2015).

Outro parâmetro que tem sido amplamente utilizado para analisar o estado emocional de cães é a variabilidade da frequência cardíaca, uma vez que é determinada pela capacidade do sistema nervoso autônomo de ajustar dinamicamente sua resposta parassimpática ou simpática de acordo com o ambiente e por não sofrer tanta interferência externa quanto a frequência cardíaca (KATAYAMA *et al.*, 2016; BOWMAN *et al.*, 2017; WORMALD, *et al.*, 2017). Estudos evidenciaram menor variabilidade da frequência cardíaca em cães sob condições estressantes, denotando menor capacidade de adaptação a fatores fisiológicos e psicológicos (WORMALD *et al.*, 2017).

Elevações nos valores de frequência respiratória e temperatura retal em cães hospitalizados também são descritas como anormalidades decorrentes do estresse (BRAGG *et al.*, 2015). Dentre as alterações comportamentais relacionadas ao estresse, descrevem-se: vocalização, vigilância, anorexia, tremores, tentativa de fuga, automutilação e eliminação inadequada (DRESCHER; GRANGER, 2005; PEREGO; PROVERBIO; SPADA, 2014; KARTASHOVA *et al.*, 2021).

No que tange minimizar as alterações fomentadas pelos potenciais fatores estressantes aos cães durante a estadia no ambiente hospitalar, condutas são recomendadas, como: limpeza de superfícies a fim de reduzir odores de outros animais; utilização de ambientes silenciosos para avaliação e redução na manipulação do paciente (HERRON; SHREYER, 2014; EDWARDS *et al.*, 2019).

Outra alternativa contempla a utilização de feromônios, dentre os quais, destaca-se o feromônio análogo ao odor materno (DAP) (VAN DEN BERGUE *et al.*, 2019), que possui potencial de reduzir ansiedade em cães jovens e adultos, na medida em que mimetiza o feromônio secretado pelas glândulas sebáceas entre as cadeias mamárias de cadelas em lactação logo após o parto (PAGEAT; GAULTIER, 2003). O mecanismo de ação do DAP não está completamente elucidado, embora, acredita-se que o feromônio seja identificado pelo órgão vomeronasal dos filhotes, o qual envia projeções axonais em direção ao bulbo olfatório acessório anterior e posterior, na medida em que se conecta à amígdala, resultando em alterações comportamentais e na endocrinologia (eixo hipotálamo – hipófise – adrenal) dos cães (RIDDELL *et al.*, 2021).

Há estudos que demonstram eficiência do feromônio em minimizar comportamentos de estresse em cães hospitalizados, embora não tenham realizado avaliações nos parâmetros

cardiovasculares (MILLS *et al.*, 2006; YOUNG- ME *et al.*, 2006; SIRACUSA, 2009; YOUNG-ME *et al.*, 2010).

Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi analisar se o feromônio análogo ao odor materno afetará os parâmetros físicos, cardiovasculares e comportamentais em cães hospitalizados.

2. HIPÓTESES

Os animais sob tratamento com o feromônio análogo ao odor materno apresentarão pouca ou nenhuma alteração comportamental relacionada ao estresse; alta variabilidade cardíaca; pressão arterial sistólica, temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória normais, demonstrando menor ativação simpática no organismo.

3. OBJETIVOS

3.1- Geral

O presente estudo teve como objetivo analisar se o feromônio análogo ao odor materno afeta os parâmetros físicos, cardiovasculares e comportamentais em cães no ambiente hospitalar.

3.2- Específicos

- a) Determinar a frequência respiratória, pressão arterial sistólica e temperatura retal em cães sob efeito do feromônio análogo ao odor materno e placebo em ambiente hospitalar;
- b) Determinar as frequências cardíacas mínimas, médias e máximas em cães sob efeito do feromônio análogo ao odor materno e placebo em ambiente hospitalar;
- c) Determinar a variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo em cães sob efeito do feromônio análogo ao odor materno e placebo em ambiente hospitalar;
- d) Avaliar o tempo de sono em cães sob efeito do feromônio análogo ao odor materno e placebo em ambiente hospitalar;
- e) Avaliar características comportamentais em cães sob efeito do feromônio análogo ao odor materno e placebo em ambiente hospitalar.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- TRIAGEM

A pesquisa foi conduzida na Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária da Universidade Federal da Fronteira Sul, no município de Realeza – Paraná, após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da respectiva universidade (CEUA-UFFS) sob protocolo nº 3057301121. Todos os tutores que concordaram em participar do projeto, assinaram previamente o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I) e Termo de Anuência para Uso de Materiais Biológicos (Anexo II).

Foi realizado uma chamada pública para seleção dos cães que participariam do estudo. Como critérios de inclusão, foram selecionados apenas animais hípidos, sem raça definida (SRD), mesocefálicas, porte pequeno e na faixa etária de dois a seis anos. Como critérios de exclusão, foram desconsiderados animais que estivessem sob tratamento medicamentoso ou que apresentassem alterações nos exames de triagem.

A triagem desses animais ocorreu por meio da anamnese, exame físico, mensuração da pressão arterial sistólica (PAS), ecocardiograma, eletrocardiograma e exames laboratoriais sanguíneos (hemograma, ureia, creatinina, alanina aminotransferase, fosfatase alcalina e albumina).

4.2- O ESTUDO

Este foi um estudo prospectivo, pareado, duplo-cego, controlado por placebo, randomizado por meio de sorteio e com dois avaliadores. Todos os cães foram analisados individualmente em ambos os grupos estudados (feromônio e placebo) com intervalo de sete dias entre os tratamentos. A fim de evitar interferência nos resultados devido ao efeito de ambientação, cinco animais iniciaram as avaliações com feromônio e os outros cinco animais com placebo. Um colaborador externo foi responsável pela randomização das substâncias entre os animais.

Utilizou-se o feromônio análogo ao odor materno na forma de difusor¹ e como placebo, foi empregado solução NaCl 0,9% em um difusor. As embalagens dos difusores foram encapadas e nomeadas como “Solução 1” e “Solução 2” pelo colaborador externo, a fim de impedir a identificação das substâncias (Figura 1).

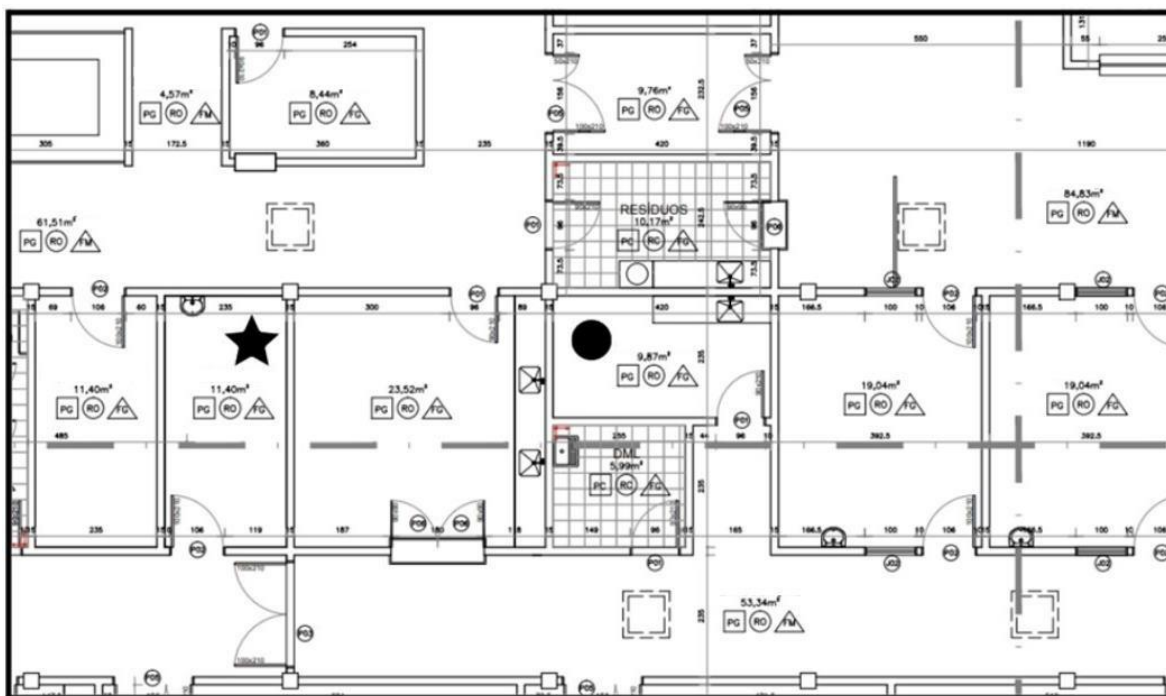
¹ Adaptil® Ceva Saúde Animal Ltda – Paulínia, São Paulo, Brasil

Figura 1 – Os difusores elétricos utilizados ao longo da experimentação foram encapados como substância 1 (DAP) e substância 2 (placebo), para que a pesquisa permanecesse cega até a última coleta dos dados experimentais.



Os animais permaneceram durante 24 horas no ambiente hospitalar, em duas salas com aproximadamente 11,4 m² e 9,87 m², sendo uma delas destinada ao emprego do feromônio análogo ao odor materno e a outra ao placebo respectivamente. Salienta-se que as salas se localizavam no centro da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária e próxima uma da outra, de tal modo que interferências externas eram semelhantes em ambos os locais (Figura 2).

Figura 2. Mapa do ambiente hospitalar onde foi realizada a pesquisa. *Círculo*: sala de experimentação da substância feromônio análogo ao odor materno. *Estrela*: sala de experimentação da substância placebo



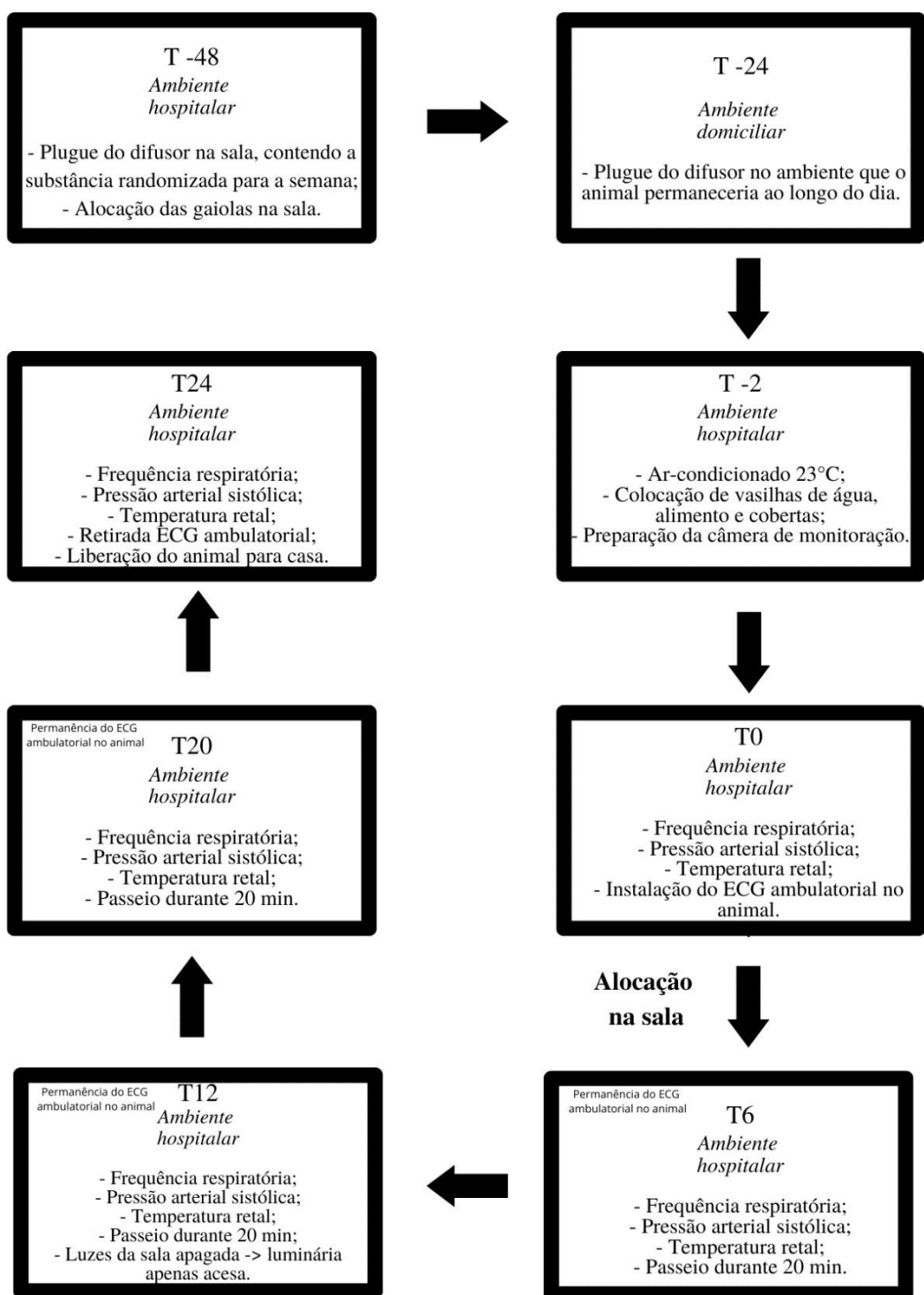
As salas foram preparadas 48 horas antes do início do estudo (T-48), por meio de alocação de gaiolas de aço inoxidável (120 x 80 x 60 cm) e plugue do difusor contendo a substância a ser estudada durante a semana. No dia anterior ao início do estudo (T -24), os tutores plugaram o difusor, contendo a substância a ser empregada no dia posterior, no cômodo da casa que o animal permaneceria ao longo do dia.

Duas horas antes do início do estudo (T -2), o ar-condicionado foi ligado respeitando temperatura de 23 °C. Foi instalada uma câmera para gravação e monitoração do animal no período em que o mesmo estivesse confinado, a fim de detectar eventuais variações comportamentais durante o estudo. Cobertas e vasilhas contendo água fresca e ração à vontade foram dispostas dentro da gaiola. Salienta-se que o alimento fornecido para cada animal durante o experimento foi o mesmo que o animal estava habituado a comer, com intuito de minimizar fatores estressantes provenientes do emprego de uma nova dieta (Figura 3).

No momento basal, previamente à alocação do animal na sala (T0), foi realizada mensuração da frequência respiratória (FR), aferição da pressão arterial sistólica (PAS) e temperatura retal (TR), seguida da instalação do eletrocardiograma ambulatorial. Posteriormente, o animal foi encaminhado para a sala, onde permaneceu isoladamente durante 24 horas.

Após seis (T6), doze (T12), vinte (T20) e vinte quatro horas (T24) do início do estudo, foram realizadas novamente avaliações dos parâmetros supracitados (FR, PAS e TR), seguida da retirada do animal da sala para passeio, o qual possuía duração de 20 minutos. Faz-se importante ressaltar que após findado o passeio do momento T12, o indivíduo foi realocado na sala com as luzes desligadas, mantendo-se na sala acesa apenas uma luminária (lâmpada incandescente amarela de 15w), com o propósito de facilitar o sono do mesmo.

Figura 3. Organograma representando delineamento experimental da pesquisa



4.2.1- Avaliação experimental

4.2.1.1- Eletrocardiografia ambulatorial

Foi utilizado o eletrocardiograma ambulatorial (Holter) com gravador digital² durante 24 horas. O exame foi obtido por meio do sistema de eletrodos de quatro vias e três canais e foi considerado máximo de 5% de artefatos, sendo excluídas arritmias quando presente. A área de colocação dos eletrodos foi previamente tricotomizada sucedida de limpeza da pele com álcool 70%. Posteriormente foi efetuada a colocação dos eletrodos adesivos³ que respeitaram o seguinte posicionamento:

- Eletrodo verde: posicionado na junção costocostal no lado esquerdo do tórax, entre 5° e 6° espaços intercostais;
- Eletrodo preto: posicionado na junção costocostal no lado direito do tórax, entre o 5° e 6° espaços intercostais;
- Eletrodo branco: posicionado no manúbrio;
- Eletrodo vermelho: posicionado na cartilagem xifoide.

Com o auxílio de uma atadura, esparadrapo e bandagem elástica autoaderente, o aparelho foi fixado junto a coluna torácica do animal. O aparelho permaneceu no animal durante as 24 horas que o mesmo esteve no ambiente de estudo sob efeito dos tratamentos. Após isso, o mesmo foi retirado, o exame foi descarregado e interpretado pelo mesmo avaliador com auxílio de *software*⁴ específico.

Os parâmetros avaliados por meio da eletrocardiografia ambulatorial foram: número total de QRS, frequências cardíacas mínima, média e máxima nos momentos T0, T6, T12, T20 e T24 e a média em 24 horas e a variabilidade da frequência no domínio do tempo. Os parâmetros do VFC estão demonstrados na Tabela 1.

² Cardiolight® Cardios Sistemas - São Paulo, São Paulo, Brasil

³ Eletrodo adesivo para monitorização cardíaca 3M® - Sumaré, São Paulo, Brasil

⁴ CardioMananger S540® Cardios Sistemas -São Paulo, São Paulo, Brasil

Tabela 1. Descrição das variáveis mensuradas na variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo

Índice	Unidade	Definição
NNS	ms	Número total de ciclos normais medidos
NNNS	ms	Número total de três ciclos normais sucessivos.
NNMED	ms	Média de todos os intervalos NN.
SDNN	ms	Desvio padrão de todos os intervalos NN.
SDANN	ms	Desvio padrão da média dos intervalos NN, medida em segmentos de cinco minutos.
SDNNi	ms	Média dos desvios padrão dos intervalos NN, medidos em segmentos de cinco minutos.
RMSSD	ms	Raiz quadrada da média das diferenças sucessivas ao quadro, entre NN adjacentes.
pNN50	%	Porcentagem das diferenças sucessivas entre os intervalos NN que são maiores que 50 ms.

4.2.1.2- Frequência respiratória

Para a mensuração da FR dos animais, foi realizada a contagem dos movimentos respiratórios em um minuto (mpm), com o mínimo de contenção possível.

4.2.1.3- Temperatura retal

Para a aferição da temperatura retal, o bulbo do termômetro foi introduzido no reto do animal, permanecendo em contato direto com a mucosa retal. Após alguns segundos, o resultado foi demonstrado em graus Célsius (°C).

4.2.1.4- Pressão arterial sistólica

Foi realizada aferição indireta da PAS, com o mínimo de contenção possível, por meio do doppler vascular⁵. Os animais foram posicionados em decúbito esternal e o manguito foi disposto sobre o terço proximal da região radioulnar do membro torácico direito, sendo que o

⁵ Medmega Indústria de Equipamentos Médicos Ltda - Franca, São Paulo, Brasil

mesmo correspondeu à 30 – 40% da circunferência do membro. O transdutor do aparelho foi disposto sobre a região palmar metacarpal, seguindo os protocolos de Acierno *et al.*, (2018).

Foram realizadas sete aferições sequenciais, com variações menores que 10% entre os valores, sendo que o valor final correspondente a PAS, foi proveniente da média aritmética de todas as aferições. As aferições foram realizadas pelo mesmo avaliador.

4.2.1.5- Comportamento

As alterações comportamentais foram analisadas em tempo real e em câmeras gravadas por meio de *software*⁶. A análise foi realizada por dois avaliadores cegos e posteriormente submetidos a análise de concordância. Nos momentos em que houve impossibilidade da monitoração em tempo real pelos avaliadores, utilizou-se a gravação para análise posterior.

Monitorou-se a quantidade de horas que cada animal dormiu ao longo das 24 horas para posterior análise de tempo de sono. Ademais, foram avaliados oito parâmetros no total: “autocuidado”, tremer, vocalização, ação destrutiva, deslocamento, inquietação, eliminação e fuga (Anexo III), conforme descrito por Souza (2015). A descrição de cada parâmetro está detalhada na Tabela 2.

Os parâmetros foram classificados quanto a frequência das alterações, seguindo a escala a seguir: 0 = não observado; 1 = observado poucas vezes (menos que seis horas de ocorrência); 2 = observado frequentemente (seis a quatorze horas de ocorrência) e 3 = observado sempre (maior que quatorze horas de ocorrência), conforme descrito por Sheppard e Mills (2003).

⁶ Cisco Webex Meetings®

Tabela 2. Etograma fornecendo descrição dos comportamentos que foram analisados no estudo

Comportamento	Descrição
“Autocuidado”	Comportamentos direcionados ao próprio corpo, tais como: morder-se, lambe-se, coçar-se.
Tremer	Indício de tremor no corpo.
Vocalização	Manifestar sons vocais, como: uivar, chorar, latir e rosar.
Ação destrutiva	Tentar cavar, arranhar e/ou morder objetos do ambiente.
Deslocamento	- Bocejar: A boca abre bem por um período de alguns segundos, depois fecha; -Lamber os lábios: A língua se estende para cima para cobrir os lábios, antes de retraina na boca; - Arfar: Aumento da frequência respiratória em combinação com abertura da boca.
Inquietação	Estado de locomoção pelo ambiente.
Eliminação	Êmese, defecar ou urinar.
Fuga	Tentativa intencional de sair do ambiente, buscando possíveis acessos de saída.

Fonte: Adaptado de Shepard e Mills (2003) e Souza (2015).

4.3- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Utilizou-se o *software* G*Power® na versão 3.1.9.7 para calcular o número amostral, o qual evidenciou total de dez animais, representando poder atual de 0,83 (efeito 0,9, α 0,05 e poder estatístico 80%). Os dados foram analisados através do *software* GraphPad Prism® na versão 5.03. Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk. As variáveis paramétricas foram descritas em valores de média e desvio padrão e avaliadas por meio do teste T pareado ou de Análise de Variância (ANOVA) e posterior teste de Tukey para comparar os dados obtidos. Em contrapartida, as variáveis não paramétricas foram descritas em medianas e intervalos interquantis (25 a 75%) e avaliadas pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis e posterior teste *post-hoc* de Dunn, para comparar os dados obtidos. Já o teste de *Kappa* foi utilizado para verificar a concordância entre os avaliadores, onde um valor $< 0,40$ representou concordância razoável; o valor de 0,41 a 0,60 caracterizou concordância moderada; um valor

de 0,61 a 0,80 foi considerado concordância substancial e o valor de Kappa de 0,81 a 1,00 foi considerado concordância excelente. O nível de significância foi considerado $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Do total de doze cães avaliados, dez cães atingiram os critérios de inclusão neste estudo, sendo cinco machos e cinco fêmeas, com idade média de $4,1 \pm 1,5$ e peso médio de $6,1 \pm 2,7$ kg. Dois cães foram excluídos devido alterações nos exames de triagem. As seguintes variáveis foram classificadas como paramétricas: pressão arterial sistólica, temperatura retal, frequências cardíacas máxima, média e mínima, número total de QRS, Nnmed, SDNN, SDANN, SDNNIDX, PNN > 50 . Já como dados não paramétricos, foram enquadrados a frequência respiratória, NNNs, NNs, RMSSD e parâmetros comportamentais.

No grupo placebo, quatro animais iniciaram a experimentação durante o período matutino (40%), dois no período vespertino (20%) e quatro no período noturno (40%). Já no grupo feromônio, três animais iniciaram a experimentação durante o período matutino (30%), quatro no período vespertino (40%) e três no período noturno (30%).

A Tabela 3 demonstra os parâmetros físicos analisados nos diferentes momentos de tratamento. Não houve diferença nos parâmetros de frequência respiratória (placebo: $p = 0,8688$; feromônio: $p = 0,5277$) e pressão arterial sistólica (placebo: $p = 0,0945$; feromônio: $p = 0,5441$) ao longo de 24 horas de monitoração e entre as substâncias. A temperatura retal, no momento T0 do placebo ($38,5 \pm 0,2$ °C), foi maior do que em T6, T12, T20 e T24 ($37,8 \pm 0,4$ °C; $37,9 \pm 0,4$ °C; $37,8 \pm 0,5$ °C; $37,9 \pm 0,3$ °C), houve diferença também no momento T20 entre substâncias, sendo a temperatura retal maior no feromônio ($38,2 \pm 0,6$ °C) do que no placebo ($37,8 \pm 0,5$ °C). A frequência cardíaca máxima, no momento T0 do placebo (193 ± 23 bpm), foi menor quando comparado aos momentos T6, T12, T20 (226 ± 13 bpm; 229 ± 16 bpm; 230 ± 19 bpm, respectivamente). A frequência cardíaca média diferiu entre substâncias no momento T20, sendo maior no feromônio (120 ± 17 bpm) do que no placebo (105 ± 14 bpm). A frequência cardíaca mínima, no momento T0 do placebo (82 ± 15 bpm), foi maior do que nos momentos T6, T12, T20 e T24 (51 ± 12 bpm; 51 ± 11 bpm; 50 ± 8 bpm; 59 ± 20 bpm, respectivamente), houve diferença também no momento T6 entre substâncias, sendo maior no feromônio (60 ± 17 bpm) do que no placebo (51 ± 12 bpm).

Tabela 3 - Valores de mediana e intervalos interquartis ou médias \pm desvios padrão da frequência respiratória (FR), pressão arterial sistólica (PAS), temperatura retal (TR) e frequências cardíacas (FC) máxima, média e mínima de cães sob efeito do placebo e do feromônio análogo ao odor materno (DAP) durante o momento basal (T0), seis horas (T6), 12 horas (T12), 20 horas (T20) e 24 horas (T24)

Parâmetros	T0		T6		T12		T20		T24	
	Placebo	DAP	Placebo	DAP	Placebo	DAP	Placebo	DAP	Placebo	DAP
FR (mpm)	52 (32-118)aA	64 (47-141)aA	44 (35-53)aA	44 (32-76)aA	44 (32-77)aA	52 (38-84)aA	44 (39-131)aA	48 (32-87,8)aA	48 (36-83)aA	52 (38-88)aA
PAS (mmHg)	149 \pm 28aA	175 \pm 43aA	172 \pm 35aA	189 \pm 35aA	188 \pm 28aA	194 \pm 32aA	176 \pm 31aA	167 \pm 44aA	171 \pm 32aA	181 \pm 37aA
T (°C)	38,5 \pm 0,2aA	38,5 \pm 0,4aA	37,8 \pm 0,4bA	37,9 \pm 0,4aA	37,9 \pm 0,4bA	38,1 \pm 0,6aA	37,8 \pm 0,5bA	38,2 \pm 0,6aB	37,9 \pm 0,3bA	38,2 \pm 0,8aA
FC máx (bpm)	193 \pm 26aA	207 \pm 43aA	226 \pm 13bA	247 (221-248)aA	229 \pm 16bA	244 (227-250)aA	230 \pm 19bA	240 \pm 16aA	212 \pm 34abA	230 (166-242)aA
FC med (bpm)	119 \pm 19aA	119 \pm 26aA	108 \pm 15aA	124 \pm 21aA	108 \pm 20aA	119 \pm 15aA	105 \pm 14aA	120 \pm 17aB	102 \pm 25aA	111 \pm 28aA
FC mín (bpm)	82 \pm 15aA	77 \pm 18aA	51 \pm 12bA	60 \pm 17aB	51 \pm 11bA	56 \pm 12aA	50 \pm 8bA	56 \pm 15aA	59 \pm 20bA	65 \pm 23aA

DAP: *Dog Appeasing Pheromone*. FR: frequência respiratória. PAS: pressão arterial sistólica. T (°C): temperatura retal em graus Celcius. FC: frequência cardíaca. Médias seguidas por letras minúsculas representam diferença ao longo dos tempos pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes entre as substâncias pelo teste T pareado a 5% de probabilidade.

Na Tabela 4 estão descritas as ocorrências de alterações comportamentais relacionadas ao estresse durante 24 horas. Com relação às avaliações comportamentais não houve diferenças entre a terapia com placebo e feromônio em todos os parâmetros estudados, sendo eles: autocuidado, tremer, vocalização, atitude destrutiva, deslocamento, inquietação, eliminação e fuga.

Tabela 4 - Valores de mediana e intervalos interquartis das avaliações comportamentais de cães sob efeito do placebo e do feromônio análogo ao odor materno durante 24 horas, em ambiente hospitalar, seguindo a escala de 0 a 3, sendo 0 = não observado, 1 = observado poucas vezes (0 a 6 horas de ocorrência), 2 = observado frequentemente (6 a 14 horas de ocorrência) e 3 = observado sempre (> 14 horas de ocorrência)

Avaliação comportamental	Placebo	DAP	p
Autocuidado	1 (0-1)	1 (0-1)	0,7642
Tremer	1 (0-1)	1 (0-1)	0,7642
Vocalização	1 (1-2)	1 (1-1)	0,0901
Atitude destrutiva	1 (0-1)	1 (1-1)	0,1784
Deslocamento	1 (1-1)	1 (1-1)	0,0574
Inquietação	1 (1-1)	1 (1-2)	0,2701
Eliminação	0 (0-0)	0 (0-1)	0,4820
Fuga	1 (1-1)	1 (0,25-1)	0,4466

DAP: *Dog Appeasing Pheromone*. Nível de significância < 0,05 (p)

A Tabela 5 demonstra os dados analisados por meio da eletrocardiografia ambulatorial. Não se constatou diferença entre os tratamentos empregados em relação as frequências cardíacas mínima (p = 0,8502), média (p = 0,4490), máxima (p = 0,7281), número total de QRS (0,3150) e os parâmetros utilizados para avaliar a variabilidade da frequência cardíaca no domínio do tempo, sendo eles: NNS (p = 0,4813), NNmed (p = 0,0928), SDNN (p = 0,2642), SDANN (p = 0,7643), SDNNIDX (p = 0,1672), NNNs (p = 0,3930), RMSSD (p = 0,2176), pNN > 50 (p = 0,4359).

Tabela 5 - Valores de mediana e intervalos interquartis ou médias \pm desvios padrão de frequências cardíacas (FC) máxima, média e mínima, n° total de QRS, NNS, NN médio, SDNN, SDANN, SDNNIDX, NNNs, RMSSD, pNN > 50 de cães sob efeito do placebo e do feromônio análogo ao odor materno (DAP) durante 24 de monitorização eletrocardiográfica em ambiente hospitalar

	Placebo	DAP	p
FC mínima	41 \pm 8	43 \pm 6	0,5802
FC média	92 \pm 12	99 \pm 17	0,4490
FC máxima	250 (246-250)	250 (243-250)	0,7281
N° total QRS	118.907 \pm 15.647	129.980 \pm 23.613	0,3150
NNS	87.801 (74.652-105.036)	93.214 (84.319-111.717)	0,4813
NNmed	720,3 \pm 98,9	667,0 \pm 106,1	0,0928
SDNN	290,3 \pm 57,5	270,0 \pm 70,8	0,2642
SDANN	203,9 \pm 36,1	199,3 \pm 55,6	0,7643
SDNNIDX	209,8 \pm 56,4	192,7 \pm 55,3	0,1672
NNNs	78.407 (64.367-97.124)	83.265 (74.895-106.354)	0,3930
RMSSD	102,5 (75-154,8)	179 (94,75-203,3)	0,2176
pNN > 50	61,6 \pm 11,1	57,04 \pm 14,9	0,4359

DAP: *Dog Appeasing Pheromone*. FC: frequência cardíaca. NNS: número total de ciclos normais medidos. NNNs: número total de três ciclos medidos. NNNMED: média de todos os intervalos NN. SDNN: desvio padrão de todos os intervalos NN. SDANN: desvio padrão da média dos intervalos NN, medida em segmentos de cinco minutos. SDNNi: medida dos desvios padrão dos intervalos NN, medidos em segmentos de cinco minutos. RMSSD: Raiz quadrada da medida das diferenças sucessivas ao quadro, entre NN adjacentes. pNN50: porcentagem das diferenças sucessivas entre os intervalos NN que são maiores que 50 ms. Nível de significância < 0,05 (p).

Na Tabela 6 estão descritos os números de ocorrências ao longo do dia, representando os valores menores e maiores de frequência cardíaca mínima, média e máxima. A menor FC mínima no grupo placebo foi de 41 \pm 8 bpm e no grupo feromônio foi de 43 \pm 6 bpm, sendo que ambas ocorreram de madrugada. A menor FC média no grupo placebo foi de 66 \pm 9 bpm e no grupo feromônio 76 \pm 25 bpm, ambas também ocorreram durante a madrugada. A maior FC média no grupo placebo ocorreu no período matutino e foi de 136 \pm 17 bpm, já no grupo feromônio foi de 143 \pm 16 bpm e ocorreu no período vespertino. A maior FC máxima no grupo placebo foi de 246 \pm 9 bpm, ocorrendo pela madrugada e no grupo feromônio foi 244 \pm 12 bpm, ocorrendo no período matutino. Isso demonstra que, habitualmente, as menores frequências cardíacas foram observadas durante a madrugada, já as maiores frequências cardíacas tenderam a ocorrer durante o período matutino.

Tabela 6 - Número de ocorrências distribuídos ao longo do dia representando os valores menores e maiores de FC mínima, média e máxima obtidos por avaliação eletrocardiografia ambulatorial de 24 horas de cães sob influência do placebo ou feromônio análogo ao odor materno (DAP)

Período do dia	FC mínima				FC média				FC máxima			
	Menor		Maior		Menor		Maior		Menor		Maior	
	Placebo	DAP	Placebo	DAP	Placebo	DAP	Placebo	DAP	Placebo	DAP	Placebo	DAP
Matutino (06:01-12:00)	1	2	5	4	1	1	4	7	2	1	5	7
Vespertino (12:01- 18:00)	0	2	4	3	2	0	4	1	2	2	5	3
Noturno (18:01-00:00)	2	2	0	2	0	1	2	2	3	5	4	6
Madrugada (00:01-06:00)	7	4	1	1	7	8	2	0	3	2	6	4
TOTAL DE OCORRÊNCIAS	11	10	10	10	10	10	11	10	10	10	20	20

OBS: Número foi superior ao n devido as FC semelhantes ocorrerem em diferentes períodos do dia

FC: frequência cardíaca. DAP: *Dog Appeasing Pheromone*.

Ademais, observou-se uma média de sono de 7,8 (4,5 – 12,7) horas no grupo placebo e 9,4 (6,8 – 14,7) horas no grupo feromônio, inexistindo diferença entre ambas as substâncias ($p = 0,5703$). Constatou-se que no grupo placebo, 50% do sono ocorreu ao longo da madrugada, 43% durante o período noturno e 7% durante o período matutino. Já no grupo feromônio, observou-se que 47% do sono ocorreu ao longo da madrugada, 40% durante o período noturno, 6,5% durante o período matutino e 6,5% durante o período vespertino.

Em relação ao nível de concordância entre os avaliadores, observou-se concordância substancial nos seguintes parâmetros comportamentais do grupo placebo: autocuidado ($\kappa: 0,8$), tremer ($\kappa: 0,8$), deslocamento ($\kappa: 0,63$), inquietação ($\kappa: 0,615$) e fuga ($\kappa: 0,615$), em relação ao grupo feromônio, observou-se apenas no parâmetro fuga ($\kappa: 0,615$). Foi evidenciado no grupo feromônio, concordância excelente nos seguintes parâmetros: autocuidado ($\kappa: 1,0$), tremer ($\kappa: 1,0$), vocalização ($\kappa: 1,0$), atitude destrutiva ($\kappa: 1,0$), deslocamento ($\kappa: 1,0$), inquietação ($\kappa: 1,0$) e eliminação ($\kappa: 1,0$), já no grupo placebo, constatou-se nos parâmetros vocalização ($\kappa: 1,0$), atitude destrutiva ($\kappa: 1,0$) e eliminação ($\kappa: 1,0$).

6. DISCUSSÃO

Ao conhecimento dos autores, são escassos os estudos que avaliam o efeito do feromônio análogo ao odor materno em indicadores autonômicos de cães, perante diferentes situações estressantes (AMAYA *et al.*, 2020; TAYLOR *et al.*, 2020; PUGLISI *et al.*, 2022), tampouco durante um período de hospitalização. No presente estudo foi possível avaliar com

precisão esses parâmetros, dada as recorrentes aferições ao longo do experimento, possibilitando conhecimento mais detalhado acerca do mecanismo de ação dessa substância.

No que tange aos valores de frequência respiratória, apresentaram-se acima dos parâmetros de normalidade para a espécie (15 a 30 mpm) durante todos os momentos avaliados (RISHNIW *et al.*, 2012), embora não tenha sido observado diferença entre as substâncias. Dentre os principais diferenciais para taquipneia no ambiente hospitalar está a ansiedade. O estudo de Hekman; Karas; Dreschel (2012) envolvendo cães hígidos hospitalizados, correlacionou respiração ofegante com aumento das concentrações de cortisol salivar, representando ativação do eixo simpático-medular-adrenal, que caracteriza o efeito jaleco branco.

Semelhante ao observado na frequência respiratória, valores de pressão arterial sistólica encontraram-se acima dos parâmetros de normalidade para a espécie (< 140 mmHg) durante todos os momentos avaliados (ACIERNO *et al.*, 2018), tanto no grupo placebo quando no grupo feromônio. Bragg *et al.*, (2015) demonstraram que cães hospitalizados apresentaram aumento médio da pressão arterial de 16% quando comparado ao ambiente domiciliar, sendo o maior aumento individual de 57%, indicando desse modo, que o efeito do jaleco branco é clinicamente relevante e deve ser considerado antes da implementação de protocolo terapêutico para hipertensão arterial sistêmica. Resultados similares, em relação a FR e PAS, foram encontrados por Puglisi *et al.*, (2022) durante a avaliação dos efeitos de uma nova formulação de gel contendo o DAP, em cães submetidos a exame clínico.

Já um estudo proposto por Taylor *et al.*, (2020) visando investigar o efeito do DAP no processo de separação dos cães com seus tutores, demonstrou que a temperatura ocular foi menor quando os proprietários estavam ausentes e o DAP estava ligado. Embora tenha se observado aumento da temperatura ocular quando os proprietários estavam presentes mesmo após aplicação de DAP sugerindo, que pode ter sido a presença do proprietário que afetou essa variável, em vez de qualquer efeito do DAP. Apesar do método escolhido para aferição da temperatura ser diferente do estudo citado, observou-se no grupo placebo, o aumento da temperatura retal no momento T0 quando comparado aos outros momentos, provavelmente em decorrência do estresse psicogênico ocasionado pela exposição ao novo ambiente e manipulação (TRAVAIN *et al.*, 2015). Ademais, notou-se diferença entre placebo e feromônio no momento T20, com maior temperatura retal sendo constatada no grupo feromônio, embora,

os valores referentes a temperatura retal mantiveram-se, em todos os momentos, dentro da normalidade para a espécie (37,5 - 39,2 °C) tanto no grupo placebo quanto no grupo feromônio (FEITOSA, 2008), assim como observado por Taylor *et al.*, (2020).

Outra medida autonômica utilizada para avaliar o estresse em cães é a frequência cardíaca, assim, no presente estudo observou-se no momento T0 do grupo placebo que a frequência cardíaca máxima foi menor do que nos momentos T6, T12 e T20, todavia, em todos os momentos os valores denotaram a taquicardia. Já em relação a frequência cardíaca média, observou-se aumento do parâmetro no momento T20 do grupo feromônio em relação ao grupo placebo. No grupo placebo, observou-se maior valor de frequência cardíaca mínima em T0 quando comparados aos outros momentos. Ademais, constatou-se diferença entre substâncias no momento T6, evidenciando maior valor no grupo feromônio do que no grupo placebo. Contudo, apesar das flutuações nos valores de frequência cardíaca, não se constata valor clinicamente relevante para isso, visto que em todas as situações, os valores de frequência cardíaca encontravam-se dentro da normalidade para a espécie (70 – 180 bpm) (TILLEY; SMITH JR, 2008). Em relação a frequências cardíacas médias ao longo das 24 horas de monitoração, não se constatou diferença entre os grupos estudados, corroborando novamente com os resultados observados por Taylor *et al.*, (2020).

Ressalta-se ainda, ausência de diferença na variabilidade da frequência cardíaca entre os grupos estudados, fato esse também observado por Amaya *et al.*, (2020), que avaliou o efeito do DAP na VFC em cães de abrigo expostos ao feromônio e por Taylor *et al.*, (2020). No entanto diferentes configurações experimentais e métodos de análise tenham sido usados, todos os estudos concordam que a resposta autonômica em cães diante de uma situação estressante pode não se beneficiar do tratamento com feromônio. Portanto, levanta-se duas hipóteses para isso: o efeito do DAP na resposta simpática (se houver), não foi forte o suficiente nesse estudo ou, a ativação simpática ocasionada pelo estresse psicogênico experimentado pelos cães, era muito alto para ser antagonizado pelo DAP (PUGLISI *et al.*, 2022).

Não obstante, o ritmo circadiano tende a influenciar diretamente na VFC, maiores valores são constatados no período noturno e durante a madrugada, devido maior modulação parassimpática, ao contrário dos períodos matutino e vespertino, onde maior ativação simpática é observada (MATSUNAGA *et al.*, 2001). No presente estudo, os cães iniciaram o experimento em períodos diferentes, tendo em vista isso, os valores da variabilidade da frequência cardíaca podem ter sofrido interferência em decorrência do ritmo circadiano.

No que se refere as alterações na qualidade do sono, dados em cães são escassos sobretudo em ambiente hospitalar. Em seres humanos, parâmetros como sono mais fragmentado, latência mais longa e duração mais curta do sono, também são descritas após

experiências emocionais negativas durante o dia precedente, essas situações acarretam alterações desfavoráveis na regulação do humor e da emoção (VANDEKERCKHOVE *et al.*, 2011). Apesar de não ter sido constatada diferença no tempo de sono entre as substâncias, os animais do grupo feromônio dormiram em média 1,6 horas a mais do que o placebo, denotando que o feromônio talvez tenha sido capaz de propiciar um sono de maior qualidade para os animais. Ademais, menores valores de frequência cardíaca foram observados ao longo da madrugada e maiores valores no período matutino, isso se deve a frequência do sono ter sido maior durante a madrugada, o que gera redução da frequência cardíaca de forma fisiológica, já no período matutino, os animais encontravam-se acordados, levando ao aumento da frequência cardíaca, devido a maior demanda metabólica (OKEN, SALINSKY, ELSAS, 2006; VARGA *et al.*, 2018). Com relação às avaliações comportamentais, não houve diferença entre a terapia com placebo ou feromônio em todos os parâmetros estudados, assim como observado por Grigg; Piehler (2015) e Broach; Dunham (2016), durante avaliação dos efeitos do DAP no tocante comportamental de cães alojados em canil à longo prazo e cães durante a transição de lares adotivos para canis de treinamento militar, respectivamente. Mills *et al.*, (2006), analisaram comportamento de cães com fobia de veterinário expostos ao DAP, durante procedimento padronizado de cinco minutos na sala de espera e dois minutos na sala de consulta antes de um exame físico simulado, onde não se constatou melhora do comportamento agressivo apesar dos animais encontrarem-se mais relaxados.

Acredita-se que o tempo de exposição ao feromônio possa ter sido insuficiente tanto no presente estudo quanto nos trabalhos citados anteriormente, uma vez que Gaultier *et al.*, (2008) verificaram que filhotes recém adotados reduziram a vocalização a partir do terceiro dia de exposição ao DAP. Kim *et al.*, (2010) notaram redução de vigilância, eliminação inadequada, lambedura excessiva e melhora do apetite em cães sob efeito do DAP durante quatro dias de hospitalização. Já Tod; Brander; Waran (2005) observaram redução na agitação, amplitude e frequência de latido após sete dias de exposição. Todavia, contraponto Gaultier *et al.*, (2008) e Kim *et al.*, (2010), melhora nos parâmetros de vigília, vocalização, eliminação em cães de abrigo, foram evidenciadas apenas com 60 dias de exposição aproximadamente (Osella *et al.*, 2015), levantando a hipótese de que a etiologia da situação estressante influencia também na resposta ao DAP.

A avaliação comportamental realizada por dois observadores cegos para os tratamentos empregados, obteve valores de concordância positivos por meio do teste Kappa, denotando um bom índice de confiabilidade da análise, na medida em que os menores valores corresponderam a uma concordância substancial e os maiores valores a uma concordância excelente (LANDIS; KOCH, 1977).

O curto período de exposição ao feromônio análogo ao odor materno e a ausência de padronização do horário inicial do experimento, são fatores limitantes neste estudo. Sugere-se que estudos adicionais para avaliar a eficácia do DAP na redução de parâmetros fisiológicos, cardiovasculares e comportamentais relacionados ao estresse em cães sejam realizados durante um período de exposição ao feromônio mais prolongado associado a padronização do horário de início da experimentação.

7. CONCLUSÃO

Com base nos dados coletados nesse estudo, conclui-se que a exposição ao feromônio análogo ao odor materno na apresentação de difusor, não promoveu alterações significativas em parâmetros fisiológicos, cardiovasculares e comportamentais, relacionados à redução do estresse em cães hospitalizados durante 48 horas de exposição, sugerindo não ser eficaz quando utilizado para esse fim.

REFERÊNCIAS

- ACIERNO, M.J. *et al.* Guidelines for the identification, evaluation and management of systemic hypertension in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 32, p. 1803 – 1822, 2018.
- AMAYA, V. *et al.* Effects of Olfactory and Auditory Enrichment on Heart Rate Variability in Shelter Dogs. **Animals**, v.10, p. 1 – 19, 2020.
- BOWMAN, A. *et al.* The effect of different genres of music on the stress levels of kennelled dogs. **Physiology and Behaviour**, v. 171, p. 207 – 215, 2017.
- BRAGG, R.F. *et al.* Evaluation of the effects of hospital visit stress on physiologic variables in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 246, p. 212-215, 2015.
- BROACH, D.; DUNHAM, A. E. Evaluation of a pheromone collar on canine behaviors during transition from foster homes to a training kennel in juvenile Military Working Dogs. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 14, p. 41 – 51, 2016.
- BURNARD, C. *et al.* Hair cortisol and its potential value as a physiological measure of stress response in human and non-human animals. **Animal Production Science**, v.57, p. 401-414, 2017.
- COSTANZO, L. S. **Fisiologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2015.
- DRESCHER, N.A.; GRANGER, D.A. Physiological and behavioral reactivity to stress in thunderstorm-phobic dogs and their caregivers. **Applied Animal Behaviour Science**, v.95, p. 153–168, 2005.
- EDWARDS, P.T. *et al.* Fearful Fido: Investigating dog experience in the veterinary context in an effort to reduce distress. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 213, p. 14 – 25, 2019.
- EDWARDS, P.T. *et al.* At the heart of a dog's veterinary experience: Heart rate responses in dogs vary across a standard physical examination. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 51, p. 23 – 24, 2022.
- FEITOSA, F. L. F. Exame Físico Geral ou de Rotina. In: FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária—A Arte do Diagnóstico**. 2ª edição. São Paulo (São Paulo): Editora Roca, 2008. p. 76-103.
- GAULTIER, E. *et al.* Efficacy of dog-appeasing pheromone in reducing stress associated with social isolation in newly adopted puppies. **Veterinary Record**, v. 163, p. 61 – 96, 2008.
- GRIGG, E. K.; PIEHLER, M. Influence of dog appeasing pheromone (DAP) on dogs housed in a long-term kennelling facility. **Veterinary Record Open**, v. 2, p. 1 – 5, 2015.
- GOMART, S.B.; ALLERTON, F.J.; GOMMEREN. K. Accuracy of different temperature reading techniques and associated stress response in hospitalized dogs. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 24, p. 279-85, 2014.

- GUTIÉRREZ, J. *et al.* Investigating the role of prolactin as a potential biomarker of stress in castrated male domestic dogs. **Animals**, v. 9, p. 1-13, 2019.
- HEKMAN, J.P.; KARAS, A.Z.; DRESCHER, N.A. Salivary cortisol concentrations and behavior in a population of healthy dogs hospitalized for elective procedures. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 141, p. 149-157, 2012.
- HEKMAN, J.P.; KARAS, A.Z.; SHARP, C.R. Psychogenic Stress in Hospitalized Dogs: Cross Species Comparisons, Implications for Health Care, and the Challenges of Evaluation. **Animals**, v. 4, p. 331 – 347, 2014.
- HERRON, M.E.; SHREYER, T. The Pet-Friendly Veterinary Practice: A Guide for Practitioners. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 44, p.451–481, 2014.
- KATAYAMA, M. *et al.* Heart rate variability predicts the emotional state in dogs. **Behavioural Processes**, v. 128, p. 108 – 112, 2016.
- KARTASHOVA, I. A. How to evaluate and manage stress in dogs – A guide for veterinary specialist, **Applied Animal Behavior Science**, v. 243, p. 1 – 13, 2021.
- KIM, Y. M. *et al.* Efficacy of dog-appeasing pheromone (DAP) for ameliorating separation-related behavioral signs in hospitalized dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v.51, p. 380 – 384, 2010.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, p. 159-174, 1977.
- LEFMAN, S. H.; PRITTIE, J. E. Psychogenic stress in hospitalized veterinary patients: Causation, implications, and therapies. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, v. 29, p. 107 – 120, 2019.
- MAROS, K.; DÓKA, A.; MIKLÓSI, A. Behavioural correlation of heart rate changes in family dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 109, p. 329 – 341, 2008.
- MATSUNAGA, T. *et al.* Spectral analysis of circadian rhythms in heart rate variability of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.62, p. 37 – 42, 2001.
- MILLS, D.S. *et al.* A triple blind placebo-controlled investigation into the assessment of the effect of Dog Appeasing Pheromone (DAP) on anxiety related behaviour of problem dogs in the veterinary clinic. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 98, p. 114 – 126, 2006.
- OKEN, B.S.; SALINSKY, M.C.; ELSAS, S.M. Vigilance, alertness, or sustained attention: Physiological basis and measurement. **Clinical Neurophysiology**, v. 117, p. 1885 – 1901, 2006.
- OSELLA, M. C. *et al.* Adaptive mechanisms in dogs adopted from shelters: A behavioral assessment of the use of a synthetic analogue of the canine appeasing pheromone. **Dog Behavior**, v. 2, p. 1 – 12, 2015.
- PAGEAT, P.; GAULTIER, E. Current research in canine and feline pheromones. **Veterinary Clinics of North American: Small Animal Practice**, v. 33, p. 187 – 211, 2003.

PEREGO, R.; PROVERBIO, D.; SPADA, E. Increases in heart rate and serum cortisol concentrations in healthy dogs are positively correlated with an indoor waiting-room environment. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 43, p. 67 – 71, 2014.

PICCIONE, G. *et al.* Effect of Moderate Treadmill Exercise on Some Physiological Parameters in Untrained Beagle Dogs. **Experimental Animals**, v. 61, p. 511 – 515, 2012.

PUGLISI, I. *et al.* Effects of a Novel Gel Formulation of Dog Appeasing Pheromone (DAP) on Behavioral and Physiological Stress Responses in Dogs Undergoing Clinical Examination. **Animals**, v. 12, p. 1 – 15, 2022.

RIDDELL, P. *et al.* Appeasing Pheromones for the Management of Stress and Aggression during Conservation of Wild Canids: Could the Solution Be Right under Our Nose? **Animals**, v. 11, p. 1 - 23, 2021.

RIGHI, C. *et al.* Welfare assessment in shelter dogs by using physiological and immunological parameters. **Animals**, v. 9, p. 340, 2019.

RISHNIW, M. *et al.* Sleeping respiratory rates in apparently healthy adult dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 93, p. 965–969, 2012.

SHAFFER, F.; GINSBERG, J.P. An overview of heart rate variability metrics and norms. **Frontiers in public health**, v. 5, p. 1-17, 2017.

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

SCHOBERL, I. *et al.* Psychobiological factors affecting cortisol variability in human-dog dyads. **PLoS One**, v. 12, p. 11-13, 2017.

SIRACUSA, Carlos. **Perioperative stress in dogs undergoing elective surgery: evaluation of the Dog Appeasing Pheromone (DAP) for the control of behavioural, neuroendocrine, immune and acute phase stress responses**. 2009. 139 f. Tese (Doutorado em Ciències de la Salut) - Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, 2009.

SOUZA, Carla Caroline Franzini de. **Respostas autonômicas e comportamentais ao estresse sonoro agudo em cães de companhia com histórico de fobia a sons de trovão e/ou fogos de artifício**. 2015. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2015.

TAYLOR, S. *et al.* The behavioral and physiological effects of dog appeasing pheromone upon canine behavior during separation from owner. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 40, p. 36 – 42, 2020.

TILLEY, L. P.; SMITH JUNIOR, F. W. K. Eletrocardiografia. In: TILLEY, L. P.; SMITH JUNIOR, F. W. K.; OYAMA, M. A.; SLEEPER, M. M. **Manual de Cardiologia Canina e Felina**. St. Louis (Missouri): Editora Elsevier, 2008, p. 57.

TOD, E.; BRANDER, D.; WARAN, N. Efficacy of dog appeasing pheromone in reducing stress and fear related behaviour in shelter dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 93, p. 295 – 308, 2005.

TRAVAIN, T. *et al.* Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*) - A pilot study. **Journal of Veterinary Behavior**, v. 10, p. 17 – 23, 2015.

VANDEKERCKHOVE, M. *et al.* The role of presleep negative emotion in sleep physiology. **Psychophysiology**, v. 48, p. 1738 – 1744, 2011.

VAN DEN BERGHE, F. *et al.* Dog appeasing pheromone prevents the androgen surge and may reduce contact dominance and active submission after stressful interventions in African wild dogs (*Lycaon pictus*). **PLoS One**, v. 14, p. e0212551, 2019.

VARGA, B. *et al.* Heart Rate and Heart Rate Variability during Sleep in Family Dogs (*Canis familiaris*). Moderate Effect of Pre-Sleep Emotions. **Animals**, v. 8, p. 1 - 17, 2018.

WORMALD, D. *et al.* Reduced heart rate variability in pet dogs affected by anxiety-related behaviour problems. **Physiology & Behavior**, v. 168, p. 122 – 127, 2017.

YOUNG-ME, K. *et al.* Comparison of Acupuncture with Dog-Appeasing Pheromone (DAP) Application in Separation Anxiety of Hospitalized Dogs. **Experimental Neurobiology**, v. 15, p. 81 – 87, 2006.

YOUNG-ME, K. *et al.* Efficacy of dog-appeasing pheromone (DAP) for ameliorating separation-related behavioral signs in hospitalized dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 51, p. 380 – 384, 2010.

YUKI, M. *et al.* Investigation of serum cortisol concentration as a potential prognostic marker in hospitalized dogs: a prospective observational study in a primary care animal hospital, **BMC Veterinary Research**, v. 15, p. 1-9, 2019.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa:	Efeitos cardiovasculares e comportamentais do feromônio análogo ao odor materno em cães no ambiente hospitalar
Nome do pesquisador responsável:	Tainá Minuzzo
Nome dos demais participantes:	Tatiana Champion

1. Natureza da pesquisa: o Sr. (sra.) está sendo convidada (o) a autorizar a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa que tem como finalidade observar quais são os efeitos do feromônio análogo ao odor materno e do ambiente, em parâmetros fisiológicos e comportamentais de cães hígdos, utilizando exames como ecocardiografia, aferição da pressão arterial sistólica e eletrocardiografia.

2. Identificação do(s) animal(is): Serão utilizados dez cães hígdos, porte pequeno ou médio, na faixa etária de um à oito anos. Características quanto a raça e sexo serão irrelevantes para o estudo.

3. Envolvimento na pesquisa: ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o (a) pesquisador (a) realize anamnese, exame físico, exames laboratoriais, aferição da pressão arterial sistólica, ecocardiografia, eletrocardiografia, análise comportamental, bem como, submissão do animal à um ambiente contendo difusor de solução placebo e feromônio análogo ao odor materno. O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o seu animal. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

4. Sobre os dados necessários: será realizada anamnese e exame físico geral. Será realizada a coleta de sangue para exames laboratoriais (hemograma e dosagem de ureia, creatinina, ALT, FA, albumina e proteínas totais) e realizada aferição da pressão arterial

sistólica, eletrocardiografia, ecocardiografia e análise comportamental.

5. Riscos e desconforto: a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. O feromônio análogo ao odor materno não apresenta efeitos adversos descritos. A coleta de sangue, para a realização de exames laboratoriais, pode ocasionar um pequeno desconforto no animal, embora não apresenta riscos mais relevantes. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008 e à Lei Estadual 11977, de 25 de agosto de 2008.

6. Confidencialidade: todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.

7. Benefícios: esperamos que este estudo traga informações importantes sobre o efeito do feromônio análogo ao odor materno e do ambiente hospitalar nos parâmetros fisiológicos e comportamentais em cães hípidos, de forma que o conhecimento que será construído através desta pesquisa, possa esclarecer dúvidas acerca do assunto, principalmente ao se tratar da eficácia desse fármaco na diminuição do estresse dos animais. O pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.

8. Pagamento: o Sr. (Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa:

Nome do Proprietário:				
Número de documento:	()	CPF	Inserir número:	
	()	RG	Inserir número:	

Nome e Assinatura do Proprietário

Nome e Assinatura do Pesquisador

Data: / /

TELEFONES

Pesquisadora: Tainá Minuzzo - (44) 9 9868-3306

Orientadora: Tatiana Champion - (46) 9 9113-0123

CEUA/UFFS: (46) 3543-8394

ANEXO II

TERMO DE ANUÊNCIA PARA USO DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

Conforme Resolução Normativa nº 30 (inciso 6.1.10) de 02/02/2016 do CONCEA/MCTI - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal/Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações.

Declaro para fins de direito que concedo a doação, e autorizo o uso do material biológico, abaixo descritas, para fins científicos de Ensino, Pesquisa e/ou Extensão.

1. ESPÉCIE ANIMAL: Canino;

2. MATERIAL BIOLÓGICO:

Material Biológico	Descrição	QTD
Sangue total	Check up: Hemograma, Ureia, Creatinina, Albumina, Proteína Total, Fosfata Alcalina e Alanina aminotransferase	4 ml

3. ORIGEM DO MATERIAL: O material biológico será coletado durante a avaliação de triagem, para a seleção dos animais que participarão efetivamente do projeto.

4. NOME DO(A) PROPRIETÁRIO: _____;

5. CPF/CNPJ: _____;

6. ENDEREÇO: _____;

7. TELEFONE/E-MAIL: _____;

8. TÍTULO DO PROJETO: Efeitos cardiovasculares e comportamentais do feromônio análogo ao odor materno em cães no ambiente hospitalar;

9. Finalidade: Ensino Pesquisa Treinamento/Extensão

10. RESPONSÁVEIS: Tatiana Champion e Tainá Minuzzo;

11. SETOR: Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária – Clínica Médica de Animais de Companhia;

12. INSTITUIÇÃO: Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*.

Realeza/PR,, 2022.

Assinatura: _____

(Doador)

ANEXO III

FICHA DE PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Data:		Substância:					
Nome:		Sexo:		Idade:		Peso:	
Exame físico		T0	T6	T12	T20	T24	
Frequência respiratória (mpm)							
Pressão arterial sistólica (mmHg)							
Temperatura retal (°C)							
Avaliação Comportamental		Avaliador 1		Avaliador 2			
“Autocuidado”							
Tremor							
Vocalização							
Ação Destrutiva							
Deslocamento							
Inquietação							
Eliminação							
Fuga							
<p>Escala: 0 = não observado; 1 = observado poucas vezes (< 6 horas de ocorrência); 2 = observado frequentemente (> 6 horas e < 14 horas de ocorrência) e 3 = observado sempre (>14 horas de ocorrência).</p>							
Observações:							

