

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

SARA DACHERI KIELBOWICZ

ANÁLISE DA DOR E ESTRESSE EM DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DE
OZÔNIO EM VACAS HOLANDESAS

REALEZA - PR

2024

SARA DACHERI KIELBOWICZ

**ANÁLISE DE DOR E ESTRESSE EM DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DE
OZÔNIO EM VACAS HOLANDESAS**

Defesa de dissertação, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul (PPG-SBPAS) *Campus* Realeza como requisito parcial para à obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Lizandra Do Rêgo Leal.

REALEZA - PR

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Kielbowicz, Sara Dacheri

ANÁLISE DE DOR E ESTRESSE EM DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DE OZÔNIO EM VACAS HOLANDESAS: Variabilidade da frequência cardíaca para a avaliação do estresse e dor em bovinos da raça holandesa submetidos a diferentes formas de aplicação de ozônio. Análise de comportamento de bovinos da raça holandesa submetidos a diferentes formas de aplicação de ozônio. / Sara Dacheri Kielbowicz. -- 2024.

77 f.:il.

Orientadora: Prof.ª Dr.ª Marta Lizandra do Rêgo Leal

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável Na Fronteira Sul, Realeza,PR, 2024.

I. , Marta Lizandra do Rêgo Leal, orient. II.

Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

SARA DACHERI KIELBOWICZ

**ANÁLISE DE DOR E ESTRESSE EM DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DE
OZÔNIO EM VACAS HOLANDESAS**

Defesa de dissertação, apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde, Bem-estar e Produção Animal Sustentável na Fronteira Sul (PPG-SBPAS) *Campus Realeza* como requisito parcial para à obtenção do título de mestre.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 08/03/2024.

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr.ª Marta Lizandra Do Rêgo Leal – UFFS
Orientadora



Prof.ª Dr.ª Maiara Garcia Blagitz Azevedo
Avaliadora



Prof. Dr.ª Heloisa Godoi Bertagnon
Avaliadora

AGRADECIMENTO

Esta dissertação de mestrado não teria sido concluída sem a ajuda de várias pessoas que são especiais para mim.

Primeiramente gostaria de agradecer a minha mãe Neusa Dacheri pelo apoio, carinho, motivação e respeito que recebo todos os dias. Você é um exemplo de força, resiliência, amor incondicional e desde muito cedo me ensinou que eu sou a dona do meu destino. Obrigada por me fornecer o privilégio que é ter você na minha vida. Agradeço também a minha irmã Vitoria Dacheri Kielbowicz e dois irmãos Marcos Antonio Dacheri Kielbowicz e Robson Dacheri Kielbowicz pelo carinho e momentos de descontração proporcionados por vocês.

Gostaria de agradecer ao meu namorado Dhionatan Gregol Sirtoli pelo companheirismo, paciência, dedicação, por ser um ótimo ouvinte e por me amar do jeito que sou. Obrigada por me ajudar em todas as minhas loucuras científicas. Agradeço por compartilhar minha vida com uma pessoa tão maravilhosa que sempre me apoia e me estimula a seguir os meus sonhos. Dentro do teu abraço encontrei o meu lar.

Agradeço de forma especial a minha filha felina Meliante por sempre estar do meu lado me fazendo companhia e me arrancando sorrisos diários.

Desejo também agradecer as pessoas incríveis que tive a sorte de cultivar uma amizade durante a jornada do mestrado.

A você Maria Victoria Zangrade, não existem palavras para agradecer por ter me apoiado do momento de formação da ideia de projeto até a sua finalização. Obrigada por dividir comigo os domingos de coleta, as longas horas de processamento de amostras, os surtos e momentos felizes de coleta que fazem parte da vida de pesquisador. Mas além de agradecer por me apoiar na pesquisa, tenho que agradecer por ter se tornado minha confidente e amiga do peito. Obrigada por tanto e como falamos durante todo o desenvolvimento dos nossos projetos “Ainda bem que nós temos nós”.

Agradeço ao meu amigo Davi Assenheimer, pelas boas risadas, caronas do focus, histórias e aos aprendizados (incontáveis noites fazendo lâminas de CCS diferencial). Obrigada por ter deixado minha jornada um pouco mais leve.

Agradeço também a você Fernando Gnoato por me ajudar diretamente em minha pesquisa e não medir esforços para me ensinar o que você sabe de cardiologia e estatística. Obrigada pelas caronas, jogos, conversas e por ser um ótimo colega de sala.

Agradeço a coordenadora do mestrado Tatiana Champion por ter me ajudado a desenvolver a ideia inicial do projeto, por se tornar minha orientadora substituta por alguns meses e por ser paciente com as diversas assinaturas e perguntas sobre letras estatísticas.

Agradeço a professora Maiara Blagitz Azevedo por ter me acolhido em sua sala desde o primeiro dia dessa jornada e pelo incentivo para ser uma melhor pesquisadora. Obrigada pelo acolhimento, por ser minha orientadora adotiva e pelos aprendizados. Serei eternamente grata pelo conhecimento adquirido contigo durante esta jornada.

Agradeço à minha orientadora Marta Lizandra Do Rêgo Leal que mesmo de longe sempre fez o máximo para me auxiliar e transmitir calma e tranquilidade. Obrigada pela ajuda mesmo no meio de tantas adversidades sempre fez o possível para o desenvolvimento desta pesquisa. Você é uma profissional e pessoa admirável.

As professoras Marta Lizandra Do Rêgo Leal, Maiara Blagitz Azevedo e Tatiana Champion vocês são exemplos de profissionalismo, dedicação e amor pela pesquisa e docência. Obrigada por tanto.

Agradeço ao produtor, Joari Palavesini por abrir as portas de sua propriedade para o desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço à fundação CAPES por financiar a minha pesquisa e a de muitos pós-graduandos. Muito necessária para formação e valorização dos professores e pesquisadores.

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte desta pesquisa de forma direta ou indireta que fazem parte da universidade UFFS *campus* Realeza.

Também agradeço a “Sara do passado” que mesmo com tantos desafios enfrentados durante a vida seguiu firme até aqui. Obrigada por nunca desistir dos nossos sonhos.

Por fim, dedico este documento a todos os citados anteriormente saibam que cada um ocupa um lugar especial em meu coração e serei eternamente grata.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”
(Albert Einstein).

“Viver é melhor que sonhar” (Elis Regina).

RESUMO

A bovinocultura de leite possui grande relevância socioeconômica no país. A dor em grandes animais é negligenciada. E o baixo número de escalas de dor, desenvolvidas para manejos específicos aos quais os bovinos são submetidos diariamente, reforça esta ideia. Diante do exposto é necessário avaliar a dor nesta espécie para minimizar o sofrimento e promover o bem-estar. A terapia integrativa utilizando-se o ozônio vem sendo amplamente usada na medicina veterinária, mas, até o momento, ainda não há relatos sobre a mensuração da dor durante aplicação do ozônio em animais. O objetivo deste estudo foi se a aplicação intramamária e transretal de ozônio causa dor e/ou estresse. Também foi objetivo do estudo avaliar se a aplicação intramamária em teto inflamado causa maior sensação dolorosa do que a aplicação em teto hígido. O estudo foi realizado em uma propriedade de modelo *Free stall* localizada no município Salto do Lontra -PR. Foram utilizadas 19 vacas holandesas, múltiparas, com mastite subclínica em um dos quartos mamários, ECC 3,0 e sem histórico de doenças ou processos cirúrgicos há três meses. O protocolo experimental desenvolveu-se em cinco momentos distintos, no mesmo animal, em dias subsequentes, com intervalo de 48 horas cada aplicação, iniciando pelo M0 - animal em repouso; M1- simulação da aplicação apenas com a introdução da sonda intramamária; M2 - aplicação de ozônio intramamário em teto hígido; M3 - aplicação de ozônio intramamário em teto inflamado e M4 - aplicação de ozônio transretal. A dose de ozônio utilizada foi de 35µg/ml. A dor foi avaliada por meio de exames eletrocardiográficos, escala de dor, teores de cortisol plasmático e monitoramento com colares eletrônicos. As formas de observação e avaliação de dor foram utilizadas para encontrar parâmetros alterados que fossem sugestivos de dor ou estresse no momento da aplicação do gás ozônio. Como resultados principais o parâmetro do domínio da frequência apresentou valores mais elevados da média de intervalos entre ciclos cardíacos normais no M0 quando comparados ao M2 e M3. Ademais, também foram observados maiores valores deste parâmetro no M4 em relação ao M2 e M3. Quanto à frequência cardíaca média, detectou-se menores valores no M0 em relação ao M2 e M3. Animais em repouso (M0) exibiram menores valores da frequência cardíaca máxima em relação àqueles que receberam ozônio em teto intramamário hígido (M2). Nos dados do domínio não linear o índice cardiovagal foi menor no M0 quando comparados ao M2. Quanto ao índice cardiosimpático, menores valores foram detectados no M1 em relação ao M2 e M4. Relacionado à pontuação total de todos os parâmetros da escala de dor o M0 apresentou pontuação menor em relação a três momentos experimentais: M2, M3 e M4. Ademais, o M1 foi menor que o M3. E o M3 apresentou pontuação superior ao M4. Os teores de cortisol foram menores no M0 em relação ao M1, M2 e M4. No entanto, as concentrações de cortisol foram semelhantes no M0 e M3. Nas coleiras de monitoramento a atividade foi maior no M0 do que no M2. O fator manejo de aplicação não causou sensação dolorosa nos animais, mas a associação deste manejo com a aplicação do gás ozônio levou a sensação dolorosa e estressante. Quando avaliados os resultados de forma global, detectamos que a aplicação intramamária de ozônio em teto hígido causou maiores níveis de estresse e sensação dolorosa comparada à aplicação em teto inflamado.

Palavras-chave: Bovino. Comportamento. Ozônioterapia. Intramamário. Transretal.

ABSTRACT

Dairy farming is of great socio-economic importance in the country. Pain in large animals is neglected. And the low number of pain scales developed for the specific maneuvers to which cattle are subjected on a daily basis reinforces this idea. In view of the above, it is necessary to assess pain in this species in order to minimize suffering and promote well-being. Integrative therapy using ozone has been widely used in veterinary medicine, but to date there have been no reports on the measurement of pain during ozone application in animals. The aim of this study was to determine whether the intramammary and transrectal application of ozone causes pain and/or stress. The study also aimed to assess whether intramammary application to an inflamed teat causes greater pain than application to a healthy teat. The study was carried out on a free stall property located in the municipality of Salto do Lontra -PR. We used 19 multiparous Holstein cows with subclinical mastitis in one of the mammary quarters, ECC 3.0 and no history of disease or surgery in the last three months. The experimental protocol was carried out at five different times, on the same animal, on subsequent days, with an interval of 48 hours between each application, starting with M0 - animal at rest; M1 - simulation of the application only with the introduction of the intramammary probe; M2 - application of intramammary ozone on a healthy teat; M3 - application of intramammary ozone on an inflamed teat and M4 - application of transrectal ozone. The dose of ozone used was 35µg/ml. Pain was assessed using electrocardiographic tests, a pain scale, plasma cortisol levels and monitoring with electronic collars. The forms of observation and pain assessment were used to find altered parameters that were suggestive of pain or stress at the time of ozone gas application. The main results were that the frequency domain parameter showed higher mean values for intervals between normal cardiac cycles at M0 when compared to M2 and M3. In addition, higher values of this parameter were also observed in M4 compared to M2 and M3. As for the average heart rate, lower values were found in M0 compared to M2 and M3. Animals at rest (M0) showed lower maximum heart rate values than those that received ozone in a healthy intramammary ceiling (M2). In the non-linear domain data, the cardiovagal index was lower in M0 when compared to M2. As for the cardiosympathetic index, lower values were detected in M1 compared to M2 and M4. In terms of the total score for all the parameters on the pain scale, M0 had a lower score compared to the three experimental moments: M2, M3 and M4. In addition, M1 was lower than M3. And M3 had a higher score than M4. Cortisol levels were lower at M0 than at M1, M2 and M4. However, cortisol concentrations were similar in M0 and M3. Activity in the monitoring collars was higher in M0 than in M2. The application management factor did not cause painful sensations in the animals, but the association of this management with the application of ozone gas led to painful and stressful sensations. When the results were evaluated as a whole, we found that the intramammary application of ozone to healthy teats caused higher levels of stress and painful sensations compared to the application to inflamed teats.

Keywords: Cattle. Behavior. Ozone therapy. Intramammary. Transrectal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1: Variabilidade da frequência cardíaca para a avaliação do estresse e dor em bovinos da raça holandesa submetidos a diferentes formas de aplicação de ozônio.

Quadro 1- Parâmetros de variabilidade cardíaca segundo o domínio do tempo, frequência e medidas não lineares resultantes do exame eletrocardiográfico.....29

Figura 1- Diferença no parâmetro no domínio do tempo da SDNN (desvio-padrão de todos os intervalos entre os ciclos normais a ciclos normais em unidade de medida em ms-milissegundos) de vacas leiteiras em distintos momentos experimentais M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). *** diferença entre M0 e M2 ($p \leq 0.0008$). ** diferença entre M0 e M4 ($p \leq 0.0082$); Não significativo ($p < 0,05$).....31

Figura 2- Valores do parâmetro de média (ms – milissegundos) (A), valores de frequências cardíaca média (B) e máxima (bpm – batimento por minuto) (C) em vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). Figura 2 (A) ** diferença entre M0 e M2 ($p \leq 0.0095$), * entre M0 e M3 ($p \leq 0.0124$), * diferença entre M2 e M4 ($p \leq 0,0108$) e M3 e M4 ($p \leq 0,0053$). Figura 2 (B) * diferença entre M0 e M2 ($p \leq 0.0172$), * diferença entre M0 e M3 ($p \leq 0.0340$). Figura 2 (C) * diferença entre M0 e M2 ($p \leq 0.0103$). O ns expressa que não houve diferença entre os momentos.....32

Figura 3- Diferenças nos parâmetros do domínio de medidas não lineares: A- índice cardiovagal (CVI); B- índice cardiosimpático (CSI) de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). CVI ** diferença entre M0 e M2 ($p \leq 0.0056$). CSI * diferença entre M1 e M2 (≤ 0.0407) e M1 e M4 ($p \leq 0.0293$). Não significativo (ns).....34

Artigo 2: Análise de comportamento de bovinos da raça holandesa submetidos a diferentes formas de aplicação de ozônio.

Quadro 1- Escala de dor para vacas de leite modificadas com padrões de comportamento facial e corporal incluídos no estudo e suas respectivas alterações conforme pontuação.....49

Figura 1- Valores dos padrões de comportamento facial e corporal da escala de dor: Posição da cabeça (A), Posição das orelhas (B), Expressão facial (C) e Posição da coluna vertebral (D) em vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). Figura 1 (A) expressou diferença entre os momentos experimentais M0 e M3* ($p \leq 0,0147$). Figura 1 (B) demonstrou diferença entre o M0 e M3*** ($p \leq 0,0005$). Figura 1 (C) apresentou diferença entre os momentos experimentais M0 e M1*

($p \leq 0,0103$); M0 e M2** ($p \leq 0,0012$); M0 e M3**** ($p \leq 0,0001$). Figura 1 (D) demonstrou diferença entre o M0 e M3** ($p \leq 0,0029$); M0 e M4* ($p \leq 0,0208$). O ns expressa que não houve diferença entre os momentos experimentais ($p > 0,05$).....53

Figura 2- Diferenças dos padrões de resposta a estímulos externos e comportamento da escala de dor: Atenção ao ambiente (A), Resposta a aproximação (B), Atenção ao manejo (C) e Ingestão de alimentos (D) em vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). Figura 2 (A) expressou diferença entre M0 e M1** ($p \leq 0,0085$); M0 x M2** ($p \leq 0,0033$); M0 e M3**** ($p \leq 0,0004$); M0 e M4* ($p \leq 0,0208$). Figura 2 (B) demonstrou diferença entre o M0 e M2*** ($p \leq 0,0005$); M0 e M3**** ($p \leq 0,0001$). Figura 2 (C) apresentou diferença entre M0 e M2* ($p \leq 0,0175$); M0 e M3**** ($p \leq 0,0001$); M1 e M3** ($p \leq 0,0085$); M0 e M4* ($p \leq 0,0175$). Figura 2 (D) demonstrou diferença entre o M0 e M2** ($p \leq 0,0012$); M0 e M3*** ($p \leq 0,0004$); M0 e M4* ($p \leq 0,0208$). O ns expressa que não houve diferença entre os momentos experimentais ($p > 0,05$).....53

Figura 3- Diferenças na pontuação total de todos os parâmetros da escala de dor em vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). A figura intitulada total da escala de dor expressou diferença entre o M0 e M2**** ($p \leq 0,0001$); M0 e M3**** ($p \leq 0,0001$); M0 e M4**** ($p \leq 0,0001$); M1 e M3**** ($p \leq 0,0001$) M3 e M4* ($p \leq 0,0478$). O ns expressa que não houve diferença entre os momentos experimentais ($p > 0,05$).....54

Figura 4- Diferenças nos teores de cortisol sanguíneo em vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). A figura intitulada cortisol expressou diferença entre o M0 e M1*** ($p \leq 0,0006$); M0 e M2** ($p \leq 0,0014$); M0 e M4* ($p \leq 0,0365$). O ns expressa que não houve diferença entre os momentos experimentais ($p > 0,05$).....55

Figura 5- Diferenças na atividade (tempo em estação) em vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). A figura intitulada tempo em estação durante o experimento expressou diferença entre os momentos experimentais M0 e M3* ($p \leq 0,0293$); M1 e M2*** ($p \leq 0,0008$). O ns expressa que não houve diferença entre os momentos experimentais ($p > 0,05$).....56

LISTA DE TABELAS

Artigo 1: Variabilidade da frequência cardíaca para a avaliação do estresse e dor em bovinos da raça holandesa submetidos a diferentes formas de aplicação de ozônio.

Tabela 1- Valores de mediana, intervalos interquartis (25% e 75%) e valores de *p* de domínio do tempo (SDNN e RMSS) de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal).....31

Tabela 2- Mediana, intervalos interquartis (25% e 75%) e valores de *p* de parâmetros do domínio da frequência referente a valores de média de todas as mensurações, dos valores mínimos, médios e máximos da frequência cardíaca de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal).....32

Tabela 3. Valores de mediana, intervalos interquartis (25% e 75%), valores médios e desvios padrão, e valores de *p* referentes à parâmetros de medidas não lineares de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal).....33

Artigo 2: Análise de comportamento de bovinos da raça holandesa submetidos a diferentes formas de aplicação de ozônio.

Tabela 1. Valores de mediana, intervalos interquartis (25% e 75%) e valores de *p* de dados referentes aos parâmetros da escala de dor de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal).....52

Tabela 2. Valores de mediana, intervalos interquartis (25% e 75%) e valores de *p* de dados referentes a os níveis de cortisol de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal).....55

Tabela 3. Valores de mediana, intervalos interquartis (25% e 75%), média, desvio padrão e valores de *p* de dados referentes ao parâmetro de atividade (tempo em estação) das coleiras de monitoramento de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). Valores expressos em minutos.....56

Tabela 4. Valores de mediana, intervalos interquartis (25% e 75%) e valores de *p* de dados referentes ao parâmetro de ócio das coleiras de monitoramento de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda

uretral em teto); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). Valores expressos em minutos. Valores expressos em minutos.....57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Bem-estar em bovinos.....	16
2.2 Ozonioterapia.....	17
2.3 Variabilidade da frequência cardíaca.....	18
2.4 Dor com ênfase em escalas de observação.....	19
2.5 Estresse com ênfase em teores de cortisol.....	20
2.6 Equipamento de monitoramento.....	21
3. ARTIGO 1: Variabilidade da frequência cardíaca para a avaliação do estresse e dor em bovinos da raça holandesa submetidos a diferentes formas de aplicação de ozônio.....	23
4. ARTIGO 2: Análise de comportamento de bovinos da raça holandesa submetidos a diferentes formas de aplicação de ozônio.	43
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
6. REFERÊNCIAS.....	65
7. ANEXOS.....	69

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo com mais de 214,7 milhões de animais. Atualmente é considerado o terceiro maior produtor de leite, com produção estimada de 33.490.810 toneladas de litros, perdendo apenas para Estados Unidos e Índia (FAO, 2019).

Para o sistema se manter economicamente viável é importante ser mantido o alto desempenho produtivo. Observando esse quadro mundial pode-se afirmar que a bovinocultura de leite é um importante ramo do agronegócio brasileiro que possui grande relevância socioeconômica no país (KILGOUR, 2012).

Em fazendas leiteiras o tema bem-estar é muito debatido entre médicos veterinários, produtores e consumidores dos produtos derivados da indústria láctea. Na literatura os autores relatam que os manejos, condições alimentares, sociais e ambientais que vacas são submetidas durante sua vida produtiva afetam de forma direta sua produção, saúde e comportamento (WEBB *et al.*, 2019).

Os consumidores estão cada vez mais interessados em saber em quais condições os animais de produção estão sendo criados. Desejam ter conhecimento de como são tratados durante a sua vida produtiva e se são submetidos à manejos que incluem práticas de bem estar-animal (TUCKER *et al.*, 2020).

Dentre as cinco liberdades necessárias para se promover o bem-estar animal está inclusa àquela que destaca que o animal deve ser livre de dor, de lesões e de doenças. O desconforto animal não deve ser normalizado, por isso discussões éticas vêm tendo destaque entre consumidores, produtores e médicos veterinários (WEBSTER, 2016; GRANDIN, 2014).

O tema dor e estresse em animais de produção está sendo prioridade, principalmente em países da Europa, quando se pensa em implementar novos manejos nas propriedades. No Brasil, a preocupação com o bem-estar animal aumenta gradativamente fazendo com que produtores e empresas invistam na qualidade de vida dos animais (BERGHOF; POPPE; MULDER, 2019).

Também cresce na medicina veterinária o uso de terapias integrativas, que são métodos aplicados como complemento de tratamentos da medicina convencional, que têm como objetivo aliviar sintomas e tratar animais que já tenham algum tipo de enfermidade (ARÉVALO, *et al.*, 2021).

Dentre as terapias integrativas temos a ozonioterapia que vem sendo estudada e aplicada em animais de estimação e em animais de produção. A ozonioterapia consiste na

aplicação de gás O³, que é constituído basicamente por três átomos de oxigênio (SAFIAI, *et al.*, 2018). Dentre os efeitos benéficos da ozonioterapia cita-se a melhora da oxigenação do tecido lesado, a ação imunomoduladora e a eliminação de metabólitos tóxicos (ZENG; LU, 2018).

A ozonioterapia foi regulamentada pelo resolução nº 1364 de 22 de outubro de 2020. A resolução determina que o uso de ozônio em animais deve ser indicado, prescrito e aplicado por médicos veterinários (BRASIL, 2020). Porém, até o momento, não há informações concretas sobre diferentes formas de aplicação do gás em animais de produção. E se estas formas de uso podem levar à expressão de estresse ou sensação dolorosa.

O presente estudo tem por objetivo determinar e avaliar, através de parâmetros da VFC, de parâmetros da escala de dor, dos teores de cortisol e de coleiras de monitoramento, se o manejo e a forma de aplicação intramamária e transretal de ozônio causam estímulos estressantes e/ou dolorosos em vacas holandesas em lactação. Também foi objetivo avaliar se a aplicação intramamária em teto inflamado causa maior sensação dolorosa do que a aplicação em teto hígido.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bem-estar em bovinos

O bem-estar para os animais de produção pode ser definido como, a expressão dos comportamentos emocionais e físicos, frente as situações que são impostas ao longo de sua vida na cadeia produtiva (BROOM, 1986).

Quando falamos de bem-estar animal instantaneamente as cinco liberdades são os primeiros pontos a serem mencionados. Foram redigidas por John Webster, no início da década de 1990, e, são utilizadas até os dias atuais. São parâmetros utilizados para determinar se o animal está em situação de bem-estar são divididas basicamente em cinco tópicos: o animal deve ser livre de sede e fome; livre de qualquer situação que cause desconforto; livre de sensações dolorosas, ferimentos e enfermidades; livre para expressar seus comportamentos físicos e emocionais, e livre de situações que causem medo ou angústia (WEBSTER, 2016; GRANDIN, 2014).

Na produção animal existem três pilares principais que determinam a produtividade e qualidade dos produtos que são: genética, nutrição e sanidade. Em relação à sanidade, o bem-estar animal é um ponto importante (KILGOUR, 2012).

Dentro da bovinocultura de leite boas práticas de manejo são essenciais, para manter a saúde e o bem-estar do rebanho, influenciando de forma positiva o desempenho produtivo e financeiro das fazendas. O manejo pode interferir no desempenho animal e isso pode ser explicado pela relação humano-animal (HAR) (SEABROOK, 1972).

O HAR é um conceito que consiste na investigação e descrição dos efeitos que os humanos causam de forma indireta sobre o bem-estar animal. Tem como base principal a premissa que todos os animais podem expressar medo quando estão em contato direto com humanos, afetando assim seu desenvolvimento (HEMSWORTH, 2003).

Alguns estudos descrevem que a forma que colaboradores rurais socializam com os animais de fazenda, interfere diretamente nos níveis de estresse e medo expressados (HEMSWORTH *et al.*, 1989; JONES, 1993). É importante ressaltar que o setor pecuário geral deve apresentar como características insubstituíveis para manutenção do bem-estar nas propriedades: habilidades, conhecimento e qualidade de colaboradores para criação de animais de produção (Department for Environment, Farming and Rural Affairs, 2007).

O tema bem-estar em animais de produção desperta interesse na comunidade científica principalmente quando adentramos na área de identificação e descrição de indicadores fisiológicos que exponham a resposta dos bovinos aos estressores. É necessário que haja um equilíbrio entre a produção animal sustentável e desenvolvimento de novas técnicas de prevenção e tratamento de enfermidades (BRITO *et al.*, 2020).

2.2 Ozonioterapia

O ozônio (O_3) é um gás que quimicamente é formado por três átomos de oxigênio identificados pela união de uma molécula de oxigênio com um átomo. Para realizar a aplicação nos bovinos o ozônio é extraído através de um equipamento responsável por produzir ozônio, utilizando como matéria prima o oxigênio. O equipamento consiste em um aparelho que por meio de descargas elétricas transforma o oxigênio, oriundo de um cilindro mesmo, em molécula de O_3 (ARÉVALO, *et al.*, 2021).

O mecanismo de ação está relacionado à sua atividade oxidativa. O ozônio entra em contato com a membrana celular e começa a reagir com ácidos graxos insaturados originando peróxidos hidrófilos que estimulam a formação de antioxidantes. Como benefícios auxilia na melhora da oxigenação do tecido lesado, apresenta ação imunomoduladora, agindo na eliminação de metabólitos tóxicos (ZENG; LU, 2018).

Quando utilizado na medicina veterinária pode trazer vários benefícios para os animais de produção agindo como imunoestimulador. Devido às suas propriedades oxigenadoras e catalíticas apresenta alguma ação bactericida e fungicida. Pode ser utilizado como forma alternativa de tratamento em casos de resistência por produtos comerciais ou de maneira preventiva em diversas doenças (SCIORSCI *et al.*, 2020).

Como formas de aplicação pode-se administrar o gás através de insuflação com sondas de polietileno no caso de tratamentos em quartos mamários e por via transretal (TORRICO; GAMARRA; TELES, 2018). Para o tratamento de feridas abertas (XIAO *et al.*, 2017), escaras, úlceras e lesões de cascos, o ozônio é aplicado de forma tópica através da exposição temporária em um sistema fechado, com o auxílio de uma bolsa “*bag*”. Essa forma de aplicação exige que o ozônio circule pela lesão por um tempo mínimo de 20 a 30 minutos, a forma mais utilizada nas fazendas leiteiras (FLORES; GAYON, 2019).

A geração de ozônio através do equipamento utiliza o efeito corona, concretizado por uma descarga elétrica que tem alta tensão, acerca de um fluxo de gás Oxigênio (O^2) a uma pressão próxima da atmosfera. A temperatura, o fluxo e a pressão do gás que transcorre pelo gerador define a concentração de ozônio produzido. Um botijão de oxigênio é utilizado para realizar a mistura pura de O_2+O_3 . A aplicação em bovinos é medicinal (ARÉVALO *et al.*, 2021).

2.3 Variabilidade da frequência cardíaca

O eletrocardiograma é um exame não invasivo e indolor que tem por objetivo avaliar a atividade elétrica do coração (NUNES, *et al.*, 2014). A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) analisa a atividade do sistema nervoso autônomo (SNA), mediante avaliação de flutuações instantâneas na frequência cardíaca, determinando a regulação autonômica (BIDOLI; ERHARD; DÖRING, 2022). A atividade de alguns ramos do SNA gera a variabilidade da frequência cardíaca que sofre influência direta dos sistemas fisiológicos, neurais e humorais (VON BORELL *et al.*, 2007).

O ritmo sinusal é orientado pelo sistema autônomo, mecanismo que responde à estímulos do sistema simpático e parassimpático. Em relação à frequência cardíaca quando ocorre o aumento nos batimentos o sistema simpático encontra-se mais envolvido nos processos fisiológicos, caso ocorra à diminuição o sistema parassimpático está mais presente. Assim, as flutuações no tempo entre os ciclos cardíacos são determinadas numericamente

originando marcadores quantitativos da atividade autônoma (BIDOLI; ERHARD; DÖRING, 2022).

A VFC trata-se de um método que avalia o sistema nervoso autônomo por meio de parâmetros específicos no domínio do tempo como: desvio-padrão de todos os intervalos NN (SDNN) e a raiz quadrada média de diferenças sucessivas de intervalo RR (RMSSD) (KUUSELA, 2013).

Porém, no domínio da frequência observa-se: a média de todos os intervalos normais RR (Média) e a frequência cardíaca mínima, média e máxima. No domínio de medidas não lineares: está presente a entropia aproximada, que mede a regularidade e a complexidade de uma série cronológica (ApEn), a análise de flutuação tendencial, que descreve flutuações de curto prazo (DFA alfa 1) e análise de flutuação tendencial, que descreve flutuações de longo prazo (DFA alfa 2), o índice cardiovagal (CVI) e o índice cardiosimpático (CSI) (STEIN, 2005).

A frequência cardíaca de forma isolada não é suficiente para determinar a presença de dor e estresse em bovinos. Em estudos a VFC mostrou-se mais recomendada para determinar fisiologicamente o comportamento do sistema nervoso autônomo. Na pecuária leiteira esse conjunto de parâmetros tem sido explorado para detecção de comportamentos sugestivos de dor e estresse em atividades cotidianas de manejos nos rebanhos (BORELL *et al.*, 2007).

A VFC é um parâmetro resultante da ação dos sistemas autônomos que são reguladores responsáveis por organizar a função neuro cardíaca que é construída pela comunicação entre o cérebro, coração e processo não lineares dinâmicos do sistema nervoso autônomo. A VFC está correlacionada com a regulação das trocas gasosas do coração, intestino e tônus vascular, pressão arterial e equilíbrio autonômico (GEVIRTZ; LEHRER; SCHWARTZ, 2016).

É totalmente influenciada e controlada pelo sistema nervoso central, sistemas autônomos e cardiovasculares. Os barorreceptores e quimiorreceptores estão estreitamente relacionados e possibilitam a aceleração e desaceleração da frequência do coração e trabalham como sensores no arco aórtico e artérias carótidas internas (KAREMAKER, 2009).

O barorreflexo age unindo a pressão arterial, frequência cardíaca e o tônus vagal. Observamos como reflexo dessa ligação à oscilação conjunta de todas as funções cardiovasculares normalmente se iniciando com os barorreceptores que recebem um sinal da pressão arterial que vai resultar na ativação de diversos mecanismos que alteraram o tônus vascular e a frequência cardíaca. Normalmente quando o sinal recebido for de aumento da pressão arterial as alterações observadas serão a diminuição do tônus vascular e frequência

cardíaca. Quando a pressão arterial diminuir o tônus muscular e frequência cardíaca serão aumentados (VASCHILLO *et al.*, 2002).

O responsável por gerar os pulsos para que ocorra os batimentos cardíacos é o nodo sinusal. O mesmo responde a atuação do nervo vago principal associado ao sistema parassimpático apresentando como atividade à redução da frequência cardíaca. Mudanças rápidas ou repentinas na frequência cardíaca são sempre reguladas pelo nervo vago (RANDALL *et al.*, 2003).

Fisiologicamente o SDNN apresenta valores baixos, fato que explica a oscilação da frequência cardíaca em menor quantidade durante o exame eletrocardiográfico, ou seja, a frequência cardíaca permanece estável. O SDNN aumentado significa que ocorreu alteração nos intervalos e conseqüentemente aumento da dispersão e frequência cardíaca (SHAFFER; GINSBERG, 2017).

2.4 Dor com ênfase em escalas de observação

A dor em qualquer nível leva a uma sensação desagradável, mas, serve como mecanismo importantíssimo de proteção contra injúrias e manutenção da sobrevivência. O estudo das suas manifestações fisiológicas e observação em bovinos são essenciais para determinarmos quais manejos e tratamentos causam processos dolorosos, assim mantendo os animais em situação de bem-estar (BRITO *et al.*, 2020).

A avaliação da dor em bovinos é pouco realizada nas fazendas leiteiras, muito pela falta de informações sobre os comportamentos e parâmetros que devem ser observados durante a expressão de dor. Essa negligência é associada à falta de cuidado dos colaboradores que é embasada em crenças que animais de produção não sentem dor (NUNES; PACHECO; WAGATSUMA, 2020).

Outro fato importante que reforça que a dor é bem pouco estudada nos animais de produção até pela comunidade científica, é o baixo número de escalas de dor certificadas para determinação de dor em situações específicas que são comuns dentro dos rebanhos. Isso é reforçado pela observação de diversas escalas certificadas para pequenos animais, enquanto as escalas para animais de produção são escassas (ANIL; ANIL; DEEN, 2002).

Por esses motivos é que se torna extremamente importante avaliar processos que possam causar dor nos bovinos para podermos determinar as mudanças mesmo que leves em seu comportamento. Com isto, será possível afirmar o que causa dor e quais são suas demonstrações comportamentais mais frequentes (LORENA, *et al.*, 2013).

É necessário que haja um equilíbrio entre produção animal, desenvolvimento de novas técnicas de bem-estar, limitações econômicas de produção e normalização do desconforto animal. As discussões éticas e morais vêm tendo destaque e sendo realizadas por consumidores, produtores e médicos veterinários. Principalmente por pressão da comunidade, estes temas têm levado alguns médicos veterinários e produtores a reavaliarem os sistemas de produção com o objetivo de minimizar o sofrimento animal e manter a produtividade (ANDERSON; EDMONDSON, 2013).

A sensação dolorosa pode gerar alterações comportamentais e imunológicas que podem gerar prejuízo ao bem estar-animal, bem como à produção. As escalas de dor são baseadas nas expressões de comportamentos faciais e corporais (REMNANT *et al.*, 2017).

As características faciais nos bovinos sofrem mudanças em quatro áreas principais, quando estão sofrendo processos dolorosos: primeiramente as orelhas ficam tensas, para trás e baixas. A segunda alteração ocorre na região dos olhos que ficam retraídos e tensos, formando um sulco acima dos mesmos. Terceiro ponto são os músculos faciais onde se observa tensão lateral da cabeça. A quarta área são as narinas que ficam tensas e dilatadas, formando sulcos na região anterior da mesma, ocorrendo também aumento do tônus dos lábios (GLEERUP *et al.*, 2015).

Os comportamentos corporais mais observados em animais com dor estão relacionados com respostas perante estímulos externos, seja do ambiente ou do observador, como olhar ou não para o observador, realizar atividades como comer ou ruminar, manter a cabeça em movimento, alterar a posição da coluna vertebral e modificar sua atenção ao ambiente (OLIVEIRA, *et al.*, 2014).

2.5 Estresse com ênfase em teores de cortisol

O estresse é descrito como qualquer fator que altere ou ameace a homeostase do organismo. Todas as respostas fisiológicas ao estresse estão relacionadas com a ativação de algum dos seguintes seguimentos: sistema nervoso central (SNC), sistema nervoso simpático (SNS) e eixo hipotalâmico pituitário-adrenocortical (HPA). O estresse agudo, ativa o SNS e o eixo HPA, que estimula a liberação de fatores como citocinas, prostaglandina e quimiocinas. A liberação destas substâncias pode causar a redução na frequência de alimentação e de ingestão de água, modificação de expressão de comportamento natural e de comportamento facial e corporal, além de comprometer o bem-estar em âmbito de rebanho (COLLIER; RENQUIST; XIAO, 2017).

Quando o animal é desafiado o sistema imunológico desencadeia uma resposta ao estresse agudo no eixo HPA. A resposta inicia na porção anterior do hipotálamo com a produção de substâncias liberadoras de corticotrofina como a adrenocorticotrofina (ACTH) e os glicocorticóides (cortisol). Estas irão agir no organismo, de forma negativa, suspendendo temporariamente funções relacionadas ao metabolismo digestivo, crescimento e a produção de leite (LING; HERNANDEZ; SORDILLO; ABUELO, 2018).

Dependendo do estressor também há liberação de beta-endorfinas que vão agir diretamente no sistema nervoso central. O SNC libera a epinefrina, pelo estímulo na medula adrenal, e a norepinefrina pelos nervos simpáticos periféricos, aumentando temporariamente as frequências cardíaca e respiratória e a pressão arterial, e diminuindo as contrações ruminais (MAVANGIRA; SORDILLO, 2018).

O estresse está diariamente presente na vida de uma vaca leiteira. Após a ativação do HPA ocorre a secreção do hormônio liberador de corticotropina (CRH), pelos neurônios hipotalâmicos, que estimula a liberação, através da hipófise, do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Este conjunto de acontecimentos geram a secreção do cortisol pela glândula adrenal. Momentaneamente o cortisol ajuda o animal a lidar com as situações estressantes, mas, se os estímulos forem de longo prazo, o animal sofrerá prejuízos produtivos, fisiológicos e comportamentais (LUCY; GARVERICK; SPIERS, 2022).

O cortisol na bovinocultura de leite vem sendo utilizado extensamente como um marcador para avaliar situações de estresse. Os teores podem ser mensurados, no plasma, nas fezes ou nos pelos. O aumento dessa variável está relacionado ao manejo ou injúrias que causem dor e estresse, entretanto, seus teores podem ser alterados de acordo com o manejo empregado, procedimento, raça, idade e sexo do animal submetido à manipulação (BRISTW; HOLMES, 2007).

2.6 Equipamento de monitoramento

O setor leiteiro tem investido alto na pecuária de precisão focando principalmente na análise de comportamento animal. Com o salto tecnológico da pecuária, diversos comportamentos dentro da área de bem-estar animal conseguem ser analisados e armazenados em tempo real (GRANT; DANN; WOOLPERT, 2015).

As tecnologias que são baseadas em sensores ligados a bases computadorizadas que coletam e armazenam dados, são instrumentos necessários e imprescindíveis, para avaliar

diversas mudanças comportamentais, auxiliando diretamente na detecção de problemas, reduzindo, assim, perdas produtivas futuras (GONZÁLEZ *et al.*, 2008).

Os sistemas de monitoramento utilizam sensores de movimento, som e imagem para determinar parâmetros como o ócio e a atividade em vacas leiteiras (STYGAR *et al.*, 2021). A tecnologia é ligada a uma base de dados que monitora a vaca em tempo real, criando padrões individuais, que quando alterados são sinalizados no sistema. Estas alterações comportamentais estão relacionadas à mudanças climáticas, no ciclo reprodutivo, a ocorrência de enfermidades, a situações estressantes ou dolorosas (WEARY *et al.*, 2009).

Diante disto, a análise comportamental mediante uso de sistemas automatizados é indispensável para avaliar o bem-estar (CEBALLOS *et al.*, 2021). Quando observamos a literatura vários sensores foram utilizados para mensurar o comportamento em bovinos (BENAÏSSA *et al.*, 2017; MARTISKAINEN *et al.*, 2009; REITER *et al.*, 2018; SCHIRMANN *et al.*, 2012).

É importante destacar que bovinos saudáveis, em situação de bem-estar, apresentam três comportamentos principais: atividade, ócio e ruminação. E levam cerca de oito horas por dia para realizar tais atividades (GONZÁLES, 2021).

3. ARTIGO 1

VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA PARA A AVALIAÇÃO DO ESTRESSE E DOR EM BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA SUBMETIDOS A DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DE OZÔNIO

Sara Dacheri Kielbowicz *
Marta Lizandra Do Rêgo Leal **

HIGHLIGHTS

- As formas de aplicação de ozônio alteram parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca.
- O gás ozônio causa estresse e dor quando entra em contato com mucosas.
- A aplicação intramamária de ozônio em teto hígido causa estresse e sensação dolorosa.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar por meio dos parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) se a forma de aplicação intramamária e transretal de ozônio causam estímulos estressantes e dolorosos em bovinos leiteiros. Também foi objetivo do estudo avaliar se a aplicação intramamária em teto inflamado causa maior sensação dolorosa do que a aplicação em teto hígido. Para isso foram utilizadas 19 vacas da raça Holandesa. O protocolo experimental desenvolveu-se em cinco momentos distintos no mesmo animal em dias subsequentes com intervalo de 48 horas cada aplicação, iniciando pelo M0 animal em repouso; M1 simulação da aplicação apenas com a introdução da sonda intramamária; M2 que ocorreu aplicação de ozônio intramamário em teto hígido; M3 que ocorreu aplicação de ozônio intramamário em teto inflamado e M4 que ocorreu aplicação de ozônio transretal. A concentração de ozônio utilizada foi de 35µg/ml. Nestes momentos, parâmetros sugestivos de estresse e de estímulos dolorosos foram avaliados pelo exame eletrocardiográfico convencional. Os parâmetros avaliados referentes ao domínio do tempo foram: desvio-padrão de todos os intervalos NN (SDNN) e a raiz quadrada média de diferenças sucessivas de intervalo RR (RMSSD). Quanto ao domínio da frequência avaliou-se: média de todos os intervalos normais RR (Média) e a frequência cardíaca mínima, média e máxima. No domínio de medidas não lineares avaliou-se: entropia aproximada (ApEn), análise de flutuação tendencial que descreve flutuações de curto prazo (DFA alfa 1) e análise de flutuação tendencial que descreve flutuações de longo prazo (DFA alfa 2), índice cardiovagal (CVI) e índice cardiosimpático (CSI). Quanto ao SDNN observou-se que os animais em repouso M0 apresentaram menores valores deste parâmetro quando comparados ao momento em que houve aplicação de ozônio em teto intramamário hígido (M2) e aplicação transretal (M4). Nos parâmetros do domínio da frequência, detectou-se valores mais elevados da média de

intervalos entre ciclos cardíacos normais no M0 quando comparados ao M2 e M3. Ademais, também foram observados maiores valores deste parâmetro no M4 em relação ao M2 e M3. Quanto à frequência cardíaca média, detectou-se menores valores no M0 em relação ao M2 e M3. Animais em repouso (M0) exibiram menores valores da frequência cardíaca máxima em relação àqueles que receberam ozônio em teto intramamário hígido (M2). Nos dados do domínio não linear o CVI foi menor no M0 quando comparados ao M2. Quanto ao CSI, menores valores foram detectados no M1 em relação ao M2 e M4. Mediante resultados podemos concluir que os parâmetros de variabilidade da frequência cardíaca têm potencial para avaliar estresse e dor aguda em bovinos no manejo de aplicação intramamária e transretal de ozônio. O fator manejo de aplicação não causou sensação dolorosa nos animais, mas a associação deste manejo com a aplicação do gás ozônio levou a sensação estressante e dolorosa. Ademais, a aplicação intramamária em teto hígido causou maiores níveis de estresse e dor comparada à aplicação em teto inflamado.

Palavras-chave: Dor; Eletrocardiograma; Intramamário; Transretal.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess, using heart rate variability (HRV) parameters, whether intramammary and transrectal applications of ozone cause stressful and painful stimuli in dairy cattle. The aim of the study was also to assess whether intramammary application to an inflamed teat causes greater pain than application to a healthy teat. Nineteen Holstein cows were used for this purpose. The experimental protocol was carried out at five different times on the same animal on subsequent days with an interval of 48 hours between each application, starting with M0, an animal at rest; M1, a simulation of the application with the introduction of the intramammary probe only; M2, an intramammary ozone application on a healthy teat; M3, an intramammary ozone application on an inflamed teat and M4, a transrectal ozone application. The dose of ozone used was 35µg/ml. At these times, parameters suggestive of stress and painful stimuli were assessed using conventional electrocardiography. The parameters assessed in the time domain were: standard deviation of all NN intervals (SDNN) and the root mean square of successive RR interval differences (RMSSD). As for the frequency domain, the following were evaluated: mean of all normal RR intervals (Mean) and minimum, mean and maximum heart rate. Non-linear measures included: approximate entropy (ApEn), trend fluctuation analysis describing short-term fluctuations (DFA alpha 1) and trend fluctuation analysis describing long-term fluctuations (DFA alpha 2), cardiovagal index (CVI) and cardiosympathetic index (CSI). With regard to SDNN, it was observed that animals at rest (M0) showed lower values for this parameter when compared to when ozone was applied to the healthy intramammary ceiling (M2) and transrectal application (M4). In the frequency domain parameters, higher values were found for the average intervals between normal cardiac cycles at M0 when compared to M2 and M3. In addition, higher values of this parameter were also observed at M4 compared to M2 and M3. As for mean heart rate, lower values were found at M0 compared to M2 and M3. Animals at rest (M0) showed lower maximum heart rate values than those that received ozone in a healthy intramammary ceiling (M2). In the non-linear domain data, CVI was lower in M0 when compared to M2. As for CSI, lower values were detected in M1 compared to M2 and M4. Based on the results, we can conclude that heart rate variability parameters have the potential to assess stress and acute pain in cattle during intramammary and transrectal ozone application. The application management factor did not cause painful sensations in the animals, but the association of this

management with the application of ozone gas led to stressful and painful sensations. In addition, intramammary application to a healthy teat caused higher levels of stress and pain compared to application to an inflamed teat.

Keywords: Pain; Electrocardiogram; Intramammary; Transrectal.

INTRODUÇÃO

Fisiologicamente uma vaca de leite expressa padrões enigmáticos de variabilidade da frequência cardíaca (VFC) que conseguem ser explicados pelos cálculos matemáticos. A VFC é descrita como variações e deformações na lacuna do tempo entre sucessivos batimentos cardíacos, nomeados de intervalos entre batimentos (MCCRATY; SHAFFER, 2015).

O coração saudável não é um aparelho sofisticado que tem um padrão fixo de funcionamento. Ao longo da sua performance ocorre relevantes oscilações e complexas mudanças. Esse mecanismo elaborado e flexível permite que o sistema cardiovascular se adapte de forma rápida aos desafios homeostáticos, fisiológicos e emocionais (SHAFFER; GINSBERG, 2017).

A VFC é uma metodologia não invasiva, relativamente nova e completamente específica. Trata-se de um método que avalia o sistema nervoso autônomo por meio de parâmetros específicos no domínio do tempo, frequência e parâmetros não lineares (KUUSELA, 2013).

O parâmetro de frequência cardíaca vem sendo utilizado desde a década de 1950 para determinar situações comportamentais de dor e estresse em animais de fazenda (THOMAS; MOORE, 1951). Em pesquisas mais atuais dentro do mundo científico da medicina veterinária a VFC mostrou-se mais recomendada para determinar fisiologicamente o comportamento do sistema nervoso autônomo. Na pecuária leiteira a VFC tem sido uma técnica bem explorada para detectar a presença de dor e estresse em atividades cotidianas de manejo nas propriedades (BORELL *et al.*, 2007).

Quando falamos em bem-estar em animais de produção é de interesse identificar e descrever indicadores fisiológicos que exponham a resposta dos bovinos aos fatores estressores. Além das observações das mudanças comportamentais faciais ou corporais e dos teores de cortisol sanguíneo, a VFC é um parâmetro alternativo que deve ser explorado quando se trata de avaliar estresse e dor em bovinos (KOVÁCS *et al.*, 2013).

Atualmente, a ozonioterapia é uma prática integrativa de tratamento que vem sendo estudada e aplicada na medicina veterinária, em várias espécies de animais, inclusive naquelas

de aptidão leiteira. Consiste na aplicação de gás O³, que é constituído basicamente por três átomos de oxigênio (SAFIAI, *et al.*, 2018). Esta molécula apresenta um mecanismo de ação amplo que aumenta as defesas antioxidantes e reduz, conseqüentemente, o estresse oxidativo (EO). O EO é responsável por causar injúrias em vários tecidos orgânicos e exacerbar o processo inflamatório. Pode ser considerado um pró-fármaco, pois os seus subprodutos geram efeitos biológicos (INAL *et al.*, 2011).

Dentro da aplicabilidade clínica para a medicina veterinária a ozonioterapia pode ser utilizada para o tratamento de queimaduras, feridas e úlceras (XIAO *et al.*, 2017), além de lesões de sola do casco (FLORES; GAYON, 2019), mastite (TORRICO; GAMARRA; TELES, 2018), endometrites (MALI *et al.*, 2020), doenças osteomusculares (VENDRUSCOLO, *et al.*, 2018) e doenças infecciosas como ectima contagioso (LIU *et al.*, 2006). Como formas de aplicação pode ser citado à insuflação intramamária, transretal e uso tópico em circuito fechado (bag) (SCIORSCI *et al.*, 2020).

A dor em animais de produção é muito negligenciada pela comunidade científica e produtores. Quando analisamos a literatura existe um grande déficit envolvendo padrões de dor e estresse em vacas leiteiras, principalmente quando falamos de manejos específicos (NUNES; PACHECO; WAGATSUMA, 2020).

Um exemplo é a aplicação de ozonioterapia que foi regulamentada pela resolução nº 1364 de 22 de outubro de 2020 que liberou a aplicação e prescrição da ozonioterapia em animais por médicos veterinários (BRASIL, 2020). Porém, até o momento, não há informações sobre se o ozônio é indolor ou se pode gerar estresse ou sensação dolorosa aos animais de produção.

Este trabalho traz como ineditismo o fato de estudar a VFC em vacas leiteiras em repouso ou submetidas à aplicação de ozônio por via intramamária ou transretal.

Dentro deste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar mediante parâmetros da VFC se o manejo e a forma de aplicação intramamária e transretal de ozônio causam estímulos estressantes e dolorosos em vacas holandesas em lactação. Também foi objetivo do estudo avaliar se a aplicação intramamária em teto inflamado causa maior sensação dolorosa do que a aplicação em teto hígido.

MATERIAL E MÉTODOS

Comitê de ética

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul (nº 1804050423).

Fazenda comercial e alimentação

O estudo foi realizado em uma propriedade produtora de leite modelo *Free stall* localizada no município Salto do Lontra-PR (25°47'40.2"S 53°19'36.9"W) entre os meses de junho e julho de 2023. Para o estudo foram utilizadas 19 vacas leiteiras multíparas da raça Holandesa. As vacas foram alimentadas com a seguinte dieta (valores referentes à dieta total animal/ dia): 31 kg de silagem de milho, 9 kg de ração 22%, 2 kg de farelo de soja, 2.6 kg de casquinha de soja, 3.2 kg de pré secado, 2.2 kg de caroço de algodão, 1 kg de milho moído entre outros suplementos, tamponantes, minerais e água *ad libitum*.

Crítérios de inclusão e exclusão dos animais

A primeira parte experimental consistiu na realização de uma triagem dos animais mediante o *California Mastitis Test* (CMT) para selecionar aqueles que apresentem um quarto mamário hígido e um quarto mamário com inflamação oriunda de uma mastite subclínica. Considerando a reação formada pela viscosidade sendo interpretada como resultado negativo, traços (suspeito), grau 1 (fracamente positiva), grau 2 (positiva) e grau 3 (fortemente positivo) (SCHALM; NOORLANDER., 1957).

Os animais diagnosticados com mastite subclínica através do CMT passaram por uma segunda triagem que consistia na coleta de leite e análise através da contagem de células somáticas (CCS) automática foi considerado como animais hígidos valores (abaixo de 200.000 céls/ml) e com inflamação da glândula mamária (acima de 200.000 céls/ml).

Para a inclusão no experimento, os animais foram submetidos de forma individual a várias avaliações. Foram analisadas fichas clínicas da propriedade para avaliar se o animal sofreu alguma injúria nos últimos três meses. O peso foi determinado mediante uso de fita de pesagem e a idade, raça e número de partos foram coletados nas fichas de histórico do animal na propriedade.

Na saída da sala de ordenha avaliou-se o escore de locomoção dos animais (escala:1-5) (SPRECHER; HOSPEDARIA; KANEENE., 1997), bem como o escore de condição corporal, (escala de 1-5) (BRAUN *et al* ., 1986). Durante o período de alimentação pós

ordenha as vacas também foram avaliadas quanto ao escore de fezes (escala:1-5) (ZAAIJER; KREMER; NOORDHUIZEN., 2001).

Como critérios de inclusão, o animal deveria apresentar no mínimo um quarto mamário hígido e um quarto inflamado (oriundo de uma mastite subclínica) e não apresentar nenhuma enfermidade além da mastite subclínica no período mínimo de três meses. Ser múltipara, da raça Holandesa, ter idade de 3 a 5 anos, peso médio de 300 a 600 Kg, estar produzindo média de 10 a 40 litros, não estar no período reprodutivo (ovulação ou em estro), ter escore de locomoção normal (1), escore de fezes normal (1 e 2 aceitável para vacas em lactação) e escore de condição corporal (3,0).

Qualquer animal que não se encaixasse nos padrões de inclusão, seja por apresentar outras enfermidades que cursam com estresse ou sensação dolorosa ou estarem em período seco ou pré-parto, foram excluídos do estudo.

Delineamento experimental

Com o objetivo de avaliar por meio de parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) se o manejo e a forma de aplicação intramamária e transretal de ozônio causam estímulos de estresse ou sensação dolorosa, as 19 vacas holandesas selecionadas para o estudo foram submetidas ao protocolo experimental que desenvolve-se em cinco momentos distinto, no mesmo animal, com intervalo de 48 horas, a saber: M0 avaliação da VFC normal no animal em repouso “sem intervenções”; M1 avaliação da VFC sem a aplicação do ozônio apenas com a introdução da sonda uretral em teto sadio da glândula mamária; M2 avaliação da VFC durante a aplicação de ozônio intramamário em teto hígido; M3 avaliação da VFC durante a aplicação de ozônio intramamário em teto inflamado e M4 avaliação da VFC durante a aplicação de ozônio transretal. Em todos os momentos os animais foram contidos em canzís.

A dosagem de 35µg/ml de ozônio foi utilizada para aplicação na glândula mamária hígida, inflamada e transretal (dose recomendada pelo fabricante do aparelho e descrita por Lillo *et al.*,2022). Para a aplicação do ozônio de forma segura e atóxica, o gás produzido por aparelho gerador de ozônio (OZONEVET®) foi retirado imediatamente com auxílio de seringa estéril de 60ml. Posteriormente, a seringa foi acplada a sonda de polietileno nº 06 e o ozônio então foi aplicado por via intramamária ou via transretal. Em ambas as vias o ozônio foi liberado gradualmente por um minuto. As aplicações foram realizadas pelo período da manhã.

Para a aplicação do ozônio via intramamária, o teto foi higienizado com gaze embebida em álcool 70%. Durante todo o procedimento utilizou-se luvas estéreis para minimizar a contaminação do canal durante a introdução da sonda. Antes da aplicação de ozônio por via transretal, com auxílio de luva de palpação, realizou-se a remoção das fezes do canal retal com posterior limpeza da região perianal.

Eletrocardiograma

O exame eletrocardiográfico convencional foi realizado por meio de aparelho INcardio X[®] da marca INpulse[®], com um sistema de eletrodos de quatro vias e seis derivações que realizaram a extração dos dados e posterior análise do equilíbrio vagossimpático, para determinação dos parâmetros listados no Quadro 1.

Quadro 1. Parâmetros de variabilidade cardíaca segundo o domínio do tempo, frequência e medidas não lineares resultantes do exame eletrocardiográfico.

Domínio	Sigla do parâmetro	Definição	Unidade de medida
Tempo	SDNN	Desvio-padrão de todos os intervalos entre os ciclos normais a ciclos normais.	Ms
	RMSSD	Raiz quadrada média de diferenças sucessivas de intervalos entre os ciclos normais a ciclos normais.	Ms
Frequência	FC Mín	Frequência cardíaca mínima.	Bpm
	FC Méd	Frequência cardíaca média.	Bpm
	FC Máx	Frequência cardíaca máxima.	Bpm
	Média	Média de todos os intervalos normais entre os ciclos normais a ciclos normais.	Ms
Medidas não lineares	ApEn	Entropia aproximada, que mede a regularidade e a complexidade de uma série cronológica.	Não existente
	DFA Alfa 1	Análise de flutuação tendencial, que descreve flutuações de curto prazo.	Não existente
	DFA Alfa 2	Análise de flutuação tendencial, que descreve flutuações de longo prazo.	Não existente
	CVI	Índice cardiovagal: parâmetro relacionado à atividade parassimpática.	Não existente

	CSI	Índice cardiosimpático: parâmetro relacionado à atividade parassimpática e simpática.	Não existente
--	-----	---	---------------

Significado das siglas: ms - milissegundos; bpm - batimentos por minuto.

Fonte: Adaptado de SHAFFER; GINSBERG, 2017.

Para a realização dos exames eletrocardiográficos os bovinos estavam em posição ortostática contidos em canzís. Para iniciar o exame, os eletrodos foram posicionados na pele com auxílio de pinças (jacaré), nos membros torácicos na prega do flanco (lado direito pinça de coloração vermelha e lado esquerdo amarelo) e pélvicos (lado direito pinça de coloração preta e lado esquerdo verde). Após colocação das pinças, álcool 70% foi borrifado no local na tentativa de melhorar a qualidade da superfície de contato (OLIVEIRA, *et al.*, 2008). Os dados coletados foram analisados pelo software INcardioDuo®.

O exame de eletrocardiográfico teve duração de três minutos antes do animal, ser submetido a qualquer manejo. Após este tempo, realizou-se o eletrocardiograma por dois minutos durante o manejo correspondente de cada momento (M0; M1; M2; M3 e M4). Após a introdução da sonda ou aplicação do ozônio o momento exato foi registrado em uma planilha para determinar se ocorreu o aumento ou diminuição da variabilidade da frequência cardíaca.

O eletrocardiograma foi mantido também por três minutos, após o processo de manejo, totalizando oito minutos de análise eletrocardiográfica. No total foram, 95 janelas de tempo válidas de 8 minutos (cinco janelas foram originadas por animal, ou seja, uma por momento) utilizadas para determinar a VFC. O exame eletrocardiográfico foi realizado por única pessoa durante todo o período experimental.

4.6 Análise dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e randomizado. Todos os dados analisados eram quantitativos e foram coletados e digitalizados em planilhas do Excel e analisados através do software estatístico *Graphpad Prism* (9.5.1.) Para a avaliação da distribuição dos dados foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Todos os dados foram pareados, ou seja, tem relação entre si. As variáveis paramétricas (ApEn, DFA alfa 2 e CVI) foram descritas por meio de médias e desvios padrão e analisadas por meio de *One Way ANOVA* seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey. As variáveis não paramétricas (SDNN, RMSS, Média, FC mínima, FC média, FC máxima, DFA alfa 1 e CVI)

foram descritas em medianas e intervalos interquartis (25% a 75%) e avaliadas por meio do teste de *Friedman* seguido pelo teste de comparação de médias de Dunn. O nível de significância foi de 5%.

RESULTADOS

Os dados deste estudo estão apresentados em tabelas e figuras. O número que determina os valores da VFC foi obtido por meio de fórmulas que calculam a distância entre as ondas R-R. Os dados referentes ao domínio do tempo podem ser visualizados na Tabela 1 e Figura 1.

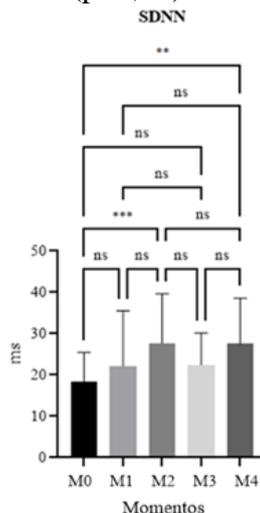
Tabela 1. Valores de mediana, intervalos interquartis (25% e 75%) e valores de *p* de parâmetros de domínio do tempo (SDNN e RMSS) de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal).

Parâmetros:	M0	M1	M2	M3	M4	Valor de <i>p</i> :
SDNN	17,69 (13,01-22,90) ^A	18,67 (13,35-28,37) ^{AB}	24,88 (19,07-39,36) ^B	19,98 (17,98-27,08) ^{AB}	25,44 (19,05-33,76) ^B	0,0262
RMSSD	5,69 (4,19-7,08) ^A	8,74 (4,24-20,38) ^A	7,15 (5,23-22,60) ^A	11 (6,16-15,20) ^A	8,44 (6,02-15,76) ^A	0,063

Letras maiúsculas distintas na mesma linha denotam diferenças entre os momentos. SDNN (Desvio-padrão de todos os intervalos entre os ciclos normais a ciclos normais), RMSSD (Raiz quadrada média de diferenças sucessivas de intervalos entre os ciclos normais a ciclos normais). Nível de significância de 5%.

No parâmetro SDNN observou-se que quando os animais estavam em repouso (M0) apresentaram menores valores em relação ao momento de introdução da sonda uretral no teto intramamário hígido (M2 - $p \leq 0,0008$) e a aplicação de ozônio transretal (M4 - $p \leq 0,0082$), (Tabela 1 e Figura 1). Não houve diferença entre os momentos no domínio do tempo RMSSD.

Figura 1. Diferença no parâmetro no domínio do tempo da SDNN (desvio-padrão de todos os intervalos entre os ciclos normais a ciclos normais em unidade de medida em ms-milissegundos) de vacas leiteiras em distintos momentos experimentais M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto intramamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). *** diferença entre M0 e M2 ($p \leq 0,0008$). ** diferença entre M0 e M4 ($p \leq 0,0082$). Não significativo ($p < 0,05$).



Os valores da média e os valores mínimos, médios e máximos da frequência cardíaca estão apresentados na Tabela 2 e Figura 2.

Tabela 2. Mediana, intervalos interquartis (25% e 75%) e valores de p dos parâmetros do domínio da frequência referente aos valores da média e das frequências cardíacas mínimas, médias e máximas de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal).

Parâmetros*:	M0	M1	M2	M3	M4	Valor de p :
Média	717,2 (703,9-742,2) ^A	712,4 (671,2-764) ^{ABC}	683,8 (640,2-713,1) ^B	672,2 (626,1-719,3) ^B	708 (677,7-756,1) ^{AC}	0,0215
FC mínima	80 (75-82) ^A	76 (72-83) ^A	80 (74-84) ^A	80 (76-88) ^A	77 (69-80) ^A	0,1561
FC média	83 (80-85) ^A	84 (78-89) ^{AB}	87 (84-93) ^B	88 (83-95) ^B	84 (78-88) ^{AB}	0,0417
FC máxima	87 (86-92) ^A	86 (81-99) ^{AB}	100 (96-105) ^B	97 (90-107) ^{AB}	93 (88-104) ^{AB}	0,008

Letras maiúsculas distintas na mesma linha denotam diferenças entre os momentos. *Média (Média de todos os intervalos normais entre os ciclos normais a ciclos normais) e FC (Frequência cardíaca).

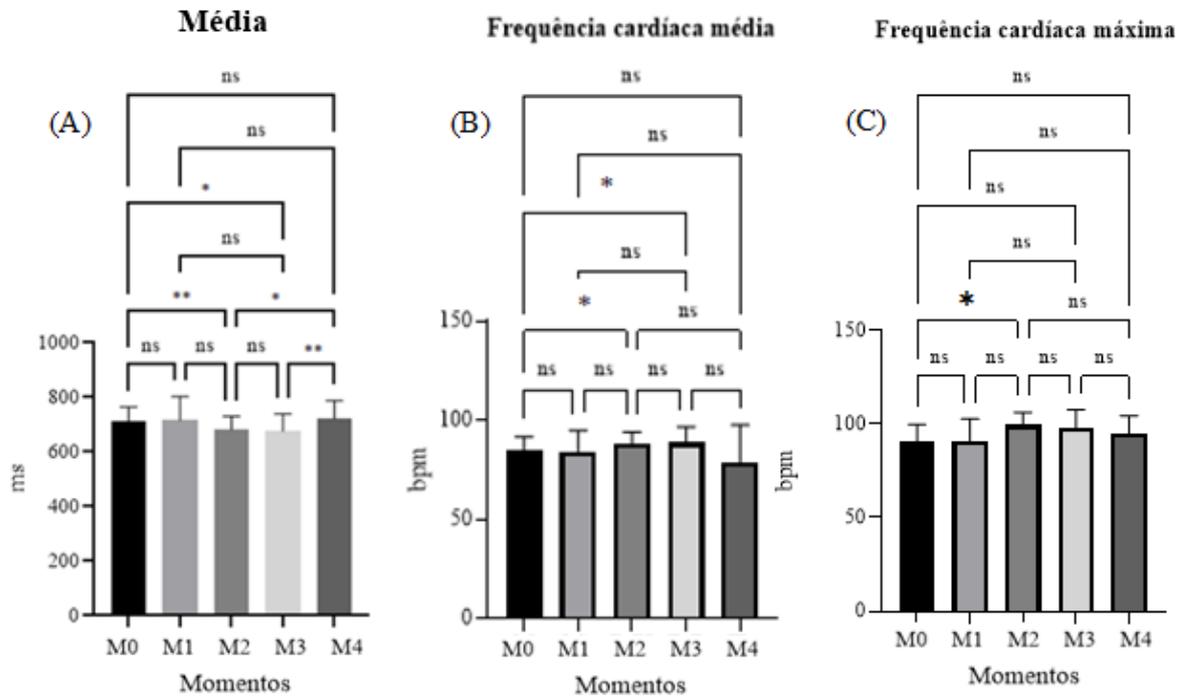
Maiores valores entre os intervalos dos ciclos cardíacos no parâmetro média foram detectados nos animais em repouso (M0) quando comparados aos momentos em que os mesmos foram submetidos à aplicação de ozônio em teto intramamário hígido (M2- $p \leq 0,0095$) e momento de aplicação de ozônio intramamário em teto inflamado (M3- $p \leq 0,01214$). Ademais, maiores valores da média foram detectados no momento em que os animais receberam aplicação de ozônio transretal (M4) em relação ao momento cuja aplicação de ozônio foi realizada em teto intramamário hígido (M2- $p \leq 0,0108$) e em teto intramamário inflamado (M3- $p \leq 0,0053$) (Tabela 2 e Figura 2A).

Quanto aos valores de frequência cardíaca média, os animais em repouso (M0) apresentaram menores valores em relação ao momento de aplicação de ozônio em teto intramamário hígido (M2- $p \leq 0,0172$) e durante aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado (M3- $p \leq 0,0340$) (Tabela 2 e Figura 2B).

Valores máximos da FC foram detectados no momento da aplicação de ozônio em teto intramamário hígido (M2- $p \leq 0,0103$) em relação ao momento de repouso dos animais (M0). Não houve diferença nos valores mínimos da FC entre os momentos ($p < 0,05$) (Tabela 2 e Figura 2C).

Figura 2. Valores do parâmetro média (ms - milissegundos) (A) e valores de frequências cardíacas média (B) e máxima (bpm – batimento por minuto) (C) de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral intramamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). Figura 2 (A) ** diferença entre M0 e M2 ($p \leq 0,0095$), * entre M0 e M3 ($p \leq 0,0124$), * diferença entre M2 e M4 ($p \leq 0,0108$) e M3 e M4 ($p \leq 0,0053$). Figura 2 (B) * diferença entre M0 e M2

($p \leq 0.0172$), * diferença entre M0 e M3 ($p \leq 0.0340$). Figura 2 (C) * diferença entre M0 e M2 ($p \leq 0.0103$). O ns expressa que não houve diferença entre os momentos.



Os dados referentes ao domínio de medidas não lineares do eletrocardiograma podem ser observados na Tabela 3 e Figura 3.

Tabela 3. Valores de mediana, intervalos interquartis (25% e 75%), valores médios e desvios padrão, e valores de p referentes a parâmetros de medidas não lineares de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal).

Parâmetros*:	M0	M1	M2	M3	M4	Valor de p :
ApEn	0,58±0,20 ^A	0,56±0,14 ^A	0,60±0,17 ^A	0,67±0,18 ^A	0,60±1,77 ^A	0,2761
DFA alfa 1	1,62 (1,43-1,74) ^A	1,51 (1,13-1,73) ^A	1,71 (1,22-1,80) ^A	1,53 (1,22-1,70) ^A	1,61 (1,28-1,69) ^A	0,3419
DFA alfa 2	1,11±0,43 ^A	0,96±0,37 ^A	1,18±0,19 ^A	1,16±0,24 ^A	1,11±0,31 ^A	0,2778
CVI	2,03±0,42 ^A	2,22±0,56 ^{AB}	2,35±0,47 ^B	2,27±0,36 ^{AB}	2,37±0,38 ^{AB}	0,0499
CSI	6,33 (3,85-8,01) ^{AB}	4,37(1,74-6,34) ^A	6,78 (3,96-8,07) ^B	4,58 (2,84-5,86) ^{AB}	6,17 (4,02-7,33) ^B	0,0145

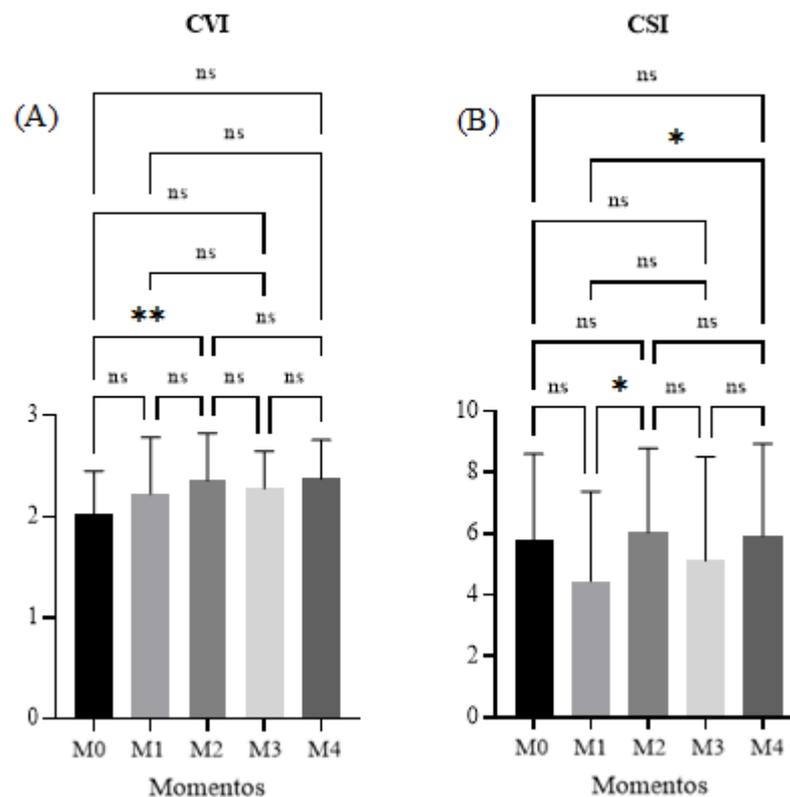
Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças entre os momentos. ApEn (Entropia aproximada, que mede a regularidade e a complexidade de uma série cronológica), DFA alfa 1 (Análise de flutuação tendencial, que descreve flutuações de curto prazo), DFA alfa 2 (Análise de flutuação tendencial, que descreve flutuações de longo prazo), CVI (Índice cardiovagal: parâmetro relacionado à atividade parassimpática) e CSI (Índice cardiosimpático: parâmetro relacionado à atividade parassimpática e simpática). *As variáveis não paramétricas (DFA alfa 1 e CSI) foram descritas por medianas e intervalos interquartis (25% a 75%) e as variáveis ApEn, DFA alfa 2 e CVI, por serem paramétricas, foram descritas por valores médios e desvios padrão. O nível de significância foi considerado $p < 0,05$.

Os resultados referentes a parâmetros de medidas não lineares estão apresentados na Tabela 3 e Figura 3. Não houve diferença entre momentos para as variáveis ApEn, DFA alfa 1

e DFA alfa 2. Menores valores do CVI foram observados nos animais em repouso (M0) quando comparado ao momento em que receberam aplicação de ozônio em teto intramamário hígido (M2 - $p \leq 0,0056$) (Tabela 3 e Figura 3A).

Quanto ao CSI, menores valores de mediana foram detectados nos animais que foram submetidos apenas a introdução de sonda intramamária (M1) quando comparado ao momento em que realizou-se aplicação de ozônio por via intramamária em teto hígido (M2 - $p \leq 0,0407$) e aplicação de ozônio via transretal (M4 - $p \leq 0,0293$) (Tabela 3 e Figura 3B).

Figura 3. Diferenças nos parâmetros do domínio de medidas não lineares: A- índice cardiovagal (CVI); B- índice cardiosimpático (CSI) de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). CVI ** diferença entre M0 e M2 ($p \leq 0.0056$). CSI * diferença entre M1 e M2 (≤ 0.0407) e M1 e M4 ($p \leq 0.0293$). Não significativo (ns).



DISCUSSÃO

Neste estudo detectamos que os animais em repouso (M0) apresentaram uma frequência cardíaca estável quando comparada à aplicação intramamária de ozônio em teto hígido (M2) e aplicação de ozônio transretal (M4). No M2 e M3 os animais apresentaram

valores elevados de SDNN. Maiores valores deste parâmetro estão associados ao aumento da frequência cardíaca (STEIN, 2005). Estes resultados podem ser associados à expressão de sensação dolorosa causada pela aplicação do ozônio nas mucosas saudáveis da glândula mamária e retal.

Mohr (2002) teve por objetivo analisar se o exame eletrocardiográfico e seus parâmetros têm funcionalidade como uma nova ferramenta de avaliação de estresse. No estudo, os parâmetros de domínio do tempo SDNN foram avaliados em bezerros, subdivididos em três grupos: G1 grupo controle, G2 grupo com estresse externo e G3 grupo com estresse interno. O autor observou diminuição do parâmetro SDNN no G2 e G3 comparados ao grupo controle G1, ou seja, o SDNN diminuiu significativamente com o aumento das cargas de estresse.

Estes resultados quando analisados do âmbito fisiológico são conflitantes, pois, já se sabe que quando a frequência cardíaca está estável ocorre a diminuição do parâmetro de SDNN e quando o animal está exposto à situações de estresse observasse a elevação dos seus níveis (KUUSELA, 2013).

Em bovinos saudáveis, a frequência cardíaca é composta por duas interações: a simpática que atua no aumento da frequência cardíaca e a regulação vagal que diminui a mesma. Em situações de repouso ou que não apresentam fatores estressantes ocorre um predomínio do sistema parassimpático por meio da atuação do nervo vago. No entanto, frente à situações estressantes ou estímulos dolorosos, tem-se um predomínio do sistema simpático com redução da influência do nervo vago (LEVY; MARTIN, 1979).

Por se tratar de um mecanismo conjunto o aumento na frequência cardíaca pode ser causado principalmente pela atividade simpática, mas, tratando-se de um mecanismo complexo e majestoso essa alteração também pode ocorrer por alterações em ambos os sistemas regulatórios. A relação entre os ramos é bastante complexa se comportando de forma síncrona e com expressão de múltiplos padrões de ativação (HAINSWORTH, 1995).

Tornando, assim, a frequência cardíaca mensurada mediante auscultação uma forma de avaliação muito relativa. No entanto, a VFC proporciona uma análise mais completa dos parâmetros e metabolismo regulatório do sistema nervoso autônomo em resposta ao estresse psicofisiológico de forma não invasiva (CERUTTI; BIANCHI; MAINARDI, 1995). O estado comportamental e psicológico pode apresentar desequilíbrio e impacto no sistema simpátovagal sem gerar nenhuma alteração nos parâmetros de frequência cardíaca (TILLER; MCCRATY; ATKINSON, 1996).

A média é um parâmetro do domínio da frequência da VFC que representa o intervalo entre todos os ciclos cardíacos. É uma média matemática de todos os ciclos cardíacos observados durante análise do exame eletrocardiográfico. Tem como padrão expor valores aumentados quando a frequência cardíaca apresenta valores normais e estáveis e, conseqüentemente, expressa valores menores quando a frequência cardíaca está elevada (SHAFFER; GINSBERG, 2017).

Neste estudo, os animais em repouso (M0) apresentaram o parâmetro de média com valores maiores em relação ao momento em que receberam aplicação de ozônio em teto intramamário hígido (M2) e em teto intramamário inflamado (M3). Estes resultados demonstram que quando em repouso os animais apresentavam frequência cardíaca estável. No M2 e M3, nos quais ocorreu aplicação intramamária de ozônio, os animais apresentaram valores de média menor. Isto significa que a frequência cardíaca estava elevada durante estes momentos experimentais, e estes resultados podem estar atrelados a uma sensação de estresse e dor.

Jong *et al.*,(2000) realizaram um estudo de estresse social por competição alimentar em suínos. Estes autores também observaram que todos os animais submetidos ao estresse apresentaram uma frequência cardíaca elevada e, conseqüentemente, a média de todos os intervalos normais RR expressou padrões mais baixos.

Também observamos que a média do M4 foi maior do que a observada no M2 e M3, ou seja, a frequência cardíaca durante a aplicação de ozônio transretal foi menor quando comparada à aplicação intramamária seja em teto hígido ou inflamado. Fato que demonstra que o uso de ozônio por via intramamária causou maior sensação dolorosa e estímulos estressantes do que por via transretal.

Referente aos dados da frequência cardíaca média pode-se observar que o M1 não diferiu dos outros momentos experimentais, ressaltando que a dor não foi causada unicamente pelo manejo da aplicação, mas, associação da liberação do gás com o manejo. O aumento da frequência cardíaca durante à aplicação intramamária de ozônio pode ser um resultado sugestivo de sensação dolorosa causada pelo gás.

Ademais, observamos que a frequência cardíaca máxima no M0 apenas diferiu da aplicação em teto intramamário hígido (M2) e não do teto intramamário inflamado (M3). Tal resultado pode estar atrelado à redução da diminuição da sensibilidade dos receptores de dor local na mucosa que se encontra alterada. A mastite subclínica é uma enfermidade que comprovadamente causa uma diminuição do limiar térmico nociceptivo, ou seja, a capacidade

da glândula mamária afetada encontra-se diminuída para perceber os estímulos dolorosos (PETERS; SILVEIRA; FISHER, 2015).

Kovács *et al.* (2015) publicaram dados referente ao domínio da frequência e relataram que vacas saudáveis diferiram estatisticamente das vacas claudicantes com valores menores. As vacas com claudicação apresentaram uma média de batimentos cardíacos acima do limiar saudável e atingiram valores que podem ser considerados indicativos de estresse e dor. Assim como no trabalho supracitado os animais deste estudo também apresentaram frequências cardíacas acima do padrão considerado fisiológico.

A dor pode ser associada a dois parâmetros que foram determinados pelo exame eletrocardiográfico: o aumento da frequência cardíaca (FC) e conseqüentemente a redução da variabilidade da frequência cardíaca (VFC). A frequência cardíaca em bovinos em situação de repouso varia entre 60 a 80 batimentos por minuto (FEITOSA, 2020). Valores superiores a 80 batimentos por minuto foram considerados acima do normal.

Ponto importante a ser destacado é que no M0 e no M1 não houve diferença na frequência cardíaca, ou seja, os animais que estavam em repouso e os animais que foram submetidos apenas ao manejo de aplicação (não tiveram contato com o gás ozônio) apresentaram valores semelhantes da frequência.

Porém, quando observamos os momentos M2, M3 e M4 comparados aos M0 e M1 os valores da frequência cardíaca foram mais elevados, indicando que os animais expressaram uma maior sensação dolorosa. O mesmo comportamento foi observado em relação a frequência cardíaca máxima. Relacionado com a forma de aplicação também observamos que no M2 e M3, momentos de aplicação intramamária do ozônio, os animais apresentaram uma maior frequência cardíaca comparada ao M4 onde a aplicação foi transretal.

Em relação aos dados da FC quando observamos a frequência cardíaca média e máxima notamos que os animais em todos os momentos apresentaram uma frequência cardíaca acima do normal para bovinos em repouso. De acordo com CEBALLOS *et al.*, 2018, o aumento da frequência cardíaca em bovinos pode estar associado à manipulação por colaboradores que não tinham convívio cotidiano com os bovinos.

No presente estudo acreditamos que o aumento da FC média e máxima pode estar associado ao manejo e as formas de administração de ozônio durante o período experimental. Novamente observamos, mediante valores da FC, que a aplicação intramamária (M2 e M3) de ozônio causa maiores alterações que são sugestivas de dor, quando comparada ao uso por via transretal (M4).

O CVI está mais relacionado à atividade parassimpática. Enquanto que o CSI mensura a atividade nervosa simpática. O CVI e CSI são parâmetros que sempre serão relacionados e analisados juntos por estarem correlacionados com a ativação dos nervos do nodo sinusal (SHAFFER; GINSBERG, 2017).

De acordo com Porges (2003), estímulos estressantes e dolorosos geram uma diminuição da atividade parassimpática no organismo. Observamos que em relação ao parâmetro CSI o M1 apresentou valores inferiores aos momentos com aplicação de ozônio em teto hígido intramamário (M2) e aplicação transretal (M4). E o CVI no M0 apresentou-se diminuído em relação ao M2. Infelizmente quando tratamos de dados do domínio não linear poucas informações são existentes e novos estudos devem ser realizados para podermos compreender melhor seu funcionamento (KOVÁCS, 2013).

BORELL *et al.*, (2007) fizeram um levantamento bibliográfico onde perceberam que a VFC é pouco estudada em bovinos. Ainda, atualmente, a medicina de produção leiteira e de corte encontram-se muito limitadas, quando entramos no campo científico da VFC. Ainda como agravante, sabemos que o bem-estar e fatores comportamentais de enfermidades e manejos básicos não são padronizados, deixando uma grande lacuna dentro da literatura.

CONCLUSÃO

Com base neste estudo evidenciamos que fatores dolorosos e estressantes geram alterações nos parâmetros do exame eletrocardiográfico de bovinos durante o manejo de aplicação intramamária e transretal de ozônio. O contato do ozônio com as mucosas corporais alterou parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca como: SDNN, média, frequência cardíaca, CVI e CSI.

O fator manejo de aplicação não causa sensação dolorosa nos animais, mas, a associação deste manejo com a aplicação do gás ozônio leva a uma sensação estressante e dolorosa. Quando analisado qual forma de aplicação causa maiores níveis de estresse constatamos que a aplicação intramamária principalmente em mucosa saudável, altera parâmetros que são associados à sensação de estresse e dor aguda.

REFERÊNCIAS

ARÉVALO, E. A. F; SILVA, D. F. D; GRABOSCHII, A. C. G; BRITO, J. V. S; ESCODRO, P. B. Ozonotherapy in the prevention and therapeutic of mastitis in dairy cows: Literature

review Ozonoterapia en la prevención y terapéutica de mastitis en vacas lecheras: **Revisión de literatura. Research, Society and Development**, v. 10, n.3, 2021.

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

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Resolução nº 1364 de 22 de outubro de 2020. **Diário Oficial da União**, 2020.

BRAUN, R. K., DONOVAN, G. A., TRAN, T. Q., SHEARER, J. K., BLISS, E. L., WEBB, D. W., BEEDE, D. K., HARRIS, B. Body condition scoring as a herd management tool. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.** v.8. pag. 62, 1986.

CEBALLOS, M. C.; SANT'ANNA, A. C.; BOIVIN, X.; COSTA, F. D. O.; CARVALHAL, M. V. D. L.; COSTA, M. J. R. D. Impact of good practices of handling training on beef cattle welfare and stockpeople attitudes and behaviors. **Livestock Science**. v. 216, Pag. 24-31, 2018.

CERUTTI, S. BIANCHI, A. M. , MAINARDI, L. T. Análise espectral do sinal de variabilidade da frequência cardíaca. M. Malik , AJ Camm (Eds.). Variabilidade da frequência cardíaca, **Futura Publ. Comp., Inc. , Armonk** , NY, 1995.

FEITOSA, F. L. F. **Semiologia veterinária: a arte do diagnóstico**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2020.

FLORES, C. E., GAYON, A. S. G. Ozonotherapy for equine laminitis. **J. Ozone Ther.** v.3, pag.16–17, 2019.

GEVIRTZ, R. N., LEHRER, P. M., SCHWARTZ, M. S. Biofeedback cardiorrespiratório. Guia pratico. **Nova York. The guilford**, 2016.

HAINSWORTH, R. O controle e a importância fisiológica da frequência cardíaca M. Malik , AJ Camm (Eds.). Variabilidade da frequência cardíaca , **Futura Publ. Comp. , Inc. , Armonk**, NY, 1995.

INAL, M., DOKUMACIOGLU, A., OZCELIK, E., UCAR, O. The effects of ozone therapy and coenzyme Q10 combination on oxidative stress markers in healthy subjects. **Ir. J. Med. Sci.** v.180, pag.703–707, 2011.

JONG, I. C., SGOIFO, A., LAMBOOIJ, E., KORTE, S. M., BLOKHUIS, H. J., KOOLHAAS, J. M. Effects of social stress on heart rate and heart rate variability in growing pigs. **Can J Anim Sci**, 2000.

KAREMAKER, J. M. Contraponto: a arritmia sinusal respiratória é devida ao mecanismo barorreflexo. **J Appl Psychol**, 2009.

KOVÁCS, L., JURKOVICH, V., BAKONY, M., SZENCI, O., PÓTI, P., TŐZSÉR, J. Welfare implication of measuring heart rate and heart rate variability in dairy cattle: literature review and conclusions for future research. **Animal**, 2015.

KOVÁCS, L., TÓZSÉR, J., M. BAKONY, M., JURKOVICH, V. *Short communication*: Changes in heart rate variability of dairy cows during conventional milking with nonvoluntary exit. **Journal of Dairy Science**. V.96, pg. 7743-7747, 2013.

KUUSELA, T. Methodological aspects of heart rate variability analysis. Heart Rate Variability (HRV) SIGNAL Analysis. **Boca Raton FL: CRC Press**, 2013.

LEVY, M.N., MARTIN, P.J. Controle neural do coração RM Berne (Ed.) , Manual de fisiologia. **American Physiological Society**, Bethesda, 1979.

LILLO, E.; CORDISCO, M.; TROTTA, A.; GRECO, G.; CARBONARI, A.; RIZZO, A.; SCIORSCI, L. R.; CORRENTE, M. Evaluation of antibacterial oxygen/ozone mixture in vitro activity on bacteria isolated from cervico-vaginal mucus of cows with acute metritis. **Rev. Theriogenology**, 2022.

LIU, J., HEO, I., HONG, M., SEO, J., JO, S., LEE, J., SONG, K., KIM, D. The therapeutic effect of ozone on contagious ecthyma in korean native goats. **J. Vet. Clin** v. 23, pag. 14–17, 2006.

MALI, S.S., RANGNEKAR, M.N., AMLE, M.B., KHILLARE, K.P., MALI, A.B., MHASE, P.P. Efficacy of intrauterine ozone therapy in repeat breeder cows with subclinical uterine infection. **Haryana Vet**. v.59, pag.83–86, 2020.

MCCRATY, R., SHAFFER, F. Heart rate variability: new perspectives on physiological mechanisms, assessment of self-regulatory capacity, and health risk. **Glob Adv Health Med**, 2015.

MOHR, E, LANGBEIN, J, NÜRNBERG, G. Heart rate variability: A noninvasive approach to measure stress in calves and cows. **Physiology & Behavior**, 2002.

NUNES, M. H. V.; PACHECO, A. D.; WAGATSUMA, J. T. Reconhecimento e avaliação da dor em bovinos: Revisão. **Pubvet**, v. 15, p. 181, 2020.

OLIVEIRA, P.C.L; PANETO, J. C. D. C; NETO, J. F. R; SILVA, R.C. Padronização da técnica de execução e parâmetros eletrocardiográficos normais, em derivações periféricas, para bovinos indianos adultos (*Bos taurus indicus*) da raça Nelore. **Ceres**. pag. 224-230, 2008.

PETERS, M.D.M., BRA, B.I.D., FISHER, V. Impacto da mastite subclínica e clínica na sensibilidade à dor de vacas leiteiras. **Animal**, 2015.

PORGES, S.W. The polyvagal theory: phylogenetic contributions to social behavior. **Physiol Behav** 2003;79:503–13. Porges SW. The polyvagal theory: phylogenetic contributions to social behavior. **Physiol Behav**, 2003.

RANDALL, D.C., BROWN, D.R., MCGUIRT, A.S., THOMPSON, G.W., ARMOR, J.A., ARDELL, J.L. As interações dentro do sistema nervoso cardíaco intrínseco contribuem para a regulação cronotrópica. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 2003.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observation leading to development of California Mastitis Test. **JAVMA: Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.130, p.199-204, 1957.

SAFIAI, M.H., KASHIM, M.I.A., ISA, F.N.M., YUSOFF, A.F., JAMSARI, E.A., ZIN, D.M.M., 2018. Application of ozone therapy as an alternative treatment in Malaysia according to islamic perspective. **Int. J. Civ. Eng. Technol.** v. 9, pag. 1444–1458, 2018.

SCIORSI, R. L.; LILLO, E.; OCCHIOGROSSO, L.; RIZZO, A. Ozone therapy in veterinary medicine: a review. **Research in veterinary science**, v. 130, p. 240-246, 2020.

SHAFFER, F., GINSBERG, J. P. An Overview of Heart Rate variability Metrics and Norms. **Frontiers in Public Health.** v. 5, 2017.

SPRECHER, D.J., HOSPEDARIA, D.E., KANEENE, J.B. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. **Theriogenology.** v.47, pag.1179-1187, 1997.

STEIN, P.K. Non-linear heart rate variability and risk stratification in cardiovascular disease. **Indian Pacing Electrophysiol**, 2005.

THOMAS, J.W., MOORE, L.A. Variations in heart rate of dairy cows. **Journal of Dairy Science.** Pag.321–328, 1951.

TORRICO, C. E. R., GAMARRA, L.A.R., TELES, O.B. Eficacia de la Ozonoterapia en el Control de Mastitis Bovina. **Research Gate**, 2018.

TILLER, W.A., MCCRATY, R., ATKINSON, M. Coerência cardíaca: uma nova medida não invasiva da ordem do sistema nervoso autônomo. **Terapias Alternativas em Saúde e Medicina**, v. 2, n. 1, pág. 52-65, 1996.

VASCHILLO, E., LEHRER, P., RISHE, N, KONSTANTINOV, M. Biofeedback da variabilidade da frequência cardíaca como método para avaliar a função barorreflexa: um estudo preliminar de ressonância no sistema cardiovascular. **appl psicofisiol biofeedback**, 2002.

VENDRUSCOLO, C.P., MOREIRA, J.J., SEIDEL, S.R.T., FÜLBER, J., NEUENSCHWANDER, H.M., BONAGURA, G., AGRESTE, F.R., BACCARIN, R.Y.A. Effects of medical ozone upon healthy equine joints: clinical and laboratorial aspects. **PLoS One.** v.13, pag.1–18, 2018.

XIAO, W., TANG, H., WU, M., LIAO, Y., LI, K., LI, L., XU, X. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/Mtor signaling pathway. **Biosci. Res.** v.37, pag. 1–11, 2017.

ZAAIJER, D., KREMER, W.D.J., NOORDHUIZER, J.P.T.M. Dairy cow monitoring in relation to fertility performance. **Cattle Practice**, v. 9, n. 3, p. 205-210, 2001.

4. ARTIGO 2

ANÁLISE DE COMPORTAMENTO DE BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA SUBMETIDOS À DIFERENTES FORMAS DE APLICAÇÃO DE OZÔNIO

Sara Dacheri Kielbowicz *
Marta Lizandra Do Rêgo Leal **

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar por meio dos parâmetros de escala de dor, dos teores de cortisol e de coleiras de monitoramento, se o manejo e a forma de aplicação intramamária e transretal de ozônio causam estímulos estressantes e dolorosos em vacas holandesas. Além de avaliar de forma simultânea se a aplicação intramamária em teto inflamado causa maior sensação estressante ou dolorosa do que a aplicação em teto hígido. Para isto foram utilizadas 19 vacas da raça Holandesa. O protocolo experimental desenvolveu-se em cinco momentos distintos no mesmo animal, em dias subsequentes com intervalo de 48 horas, a saber: M0 animal em repouso; M1 simulação da aplicação apenas com a introdução da sonda intramamária; M2 aplicação de ozônio em teto intramamário hígido; M3 aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado; M4 aplicação de ozônio transretal. A dose de ozônio utilizada foi de 35µg/ml. Os animais foram submetidos a avaliação da escala de dor, a observação da atividade e de ócio e a mensuração dos teores séricos de cortisol. Como resultados observamos diferenças em relação aos parâmetros da escala de dor como: no parâmetro de posição da cabeça e das orelhas o M0 apresentou pontuação menor em relação ao M3. Quanto a expressão facial o M0 expressou pontuação menor que os outros três momentos experimentais (M1, M2 e M3). Em relação a posição de coluna vertebral o M0 apresentou menor pontuação em relação ao M3 e o M4. No parâmetro de atenção ao ambiente o M0 apresentou pontuação menor em relação aos demais momentos experimentais (M1, M2, M3 e M4). Quanto a resposta a aproximação o M0 teve menor pontuação quando comparado ao M2 e M3. Respectivo ao parâmetro atenção ao manejo o M0 apresentou pontuação inferior ao M2, M3 e M4. Ademais o M1 foi menor que o M3. Quanto a ingestão de alimentos o M0 expressou pontuação menor em relação ao M2, M3 e M4. Relacionado a pontuação total de todos os parâmetros da escala de dor o M0 apresentou pontuação menor em relação a três momentos experimentais: M2, M3 e M4. Ademais, o M1 foi menor que o M3. E o M3 apresentou pontuação superior ao M4. Nas coleiras de monitoramento a atividade foi maior no M0 do que no M2. Os teores de cortisol plasmático foram menores no M0 em relação ao M1, M2 e M3. De acordo com os resultados podemos concluir que as formas de aplicação intramamária e transretal de ozônio associados ao manejo tem potencial de gerar sensações dolorosas e estressantes em vacas holandesas. Ademais, a aplicação de ozônio em teto intramamário hígido causou maior desconforto que a aplicação intramamária em teto acometido por mastite subclínica.

Palavras-chave: Bovinos; Cortisol; Dor; Escala facial; Transretal.

ABSTRACT

The aim of this study was to assess, using pain scale parameters, cortisol levels and monitoring collars, whether the way ozone is applied intramammary and transrectally causes stressful and painful stimuli in Holstein cows. In addition to simultaneously evaluating whether intramammary application to an inflamed teat causes greater stress or pain than application to a healthy teat. For this purpose, 19 Holstein cows were used. The experimental protocol was carried out at five different times on the same animal, on subsequent days with an interval of 48 hours: M0 animal at rest; M1 simulation of the application only with the introduction of the intramammary probe; M2 application of ozone on a healthy intramammary teat; M3 application of ozone on an inflamed intramammary teat; M4 application of transrectal ozone. The dose of ozone used was 35µg/ml. The animals were submitted to a pain scale assessment, activity and idleness observation and serum cortisol levels were measured. The results showed differences in relation to the parameters of the pain scale, such as: in the head and ear position parameter, M0 scored lower than M3. As for facial expression, M0 scored lower than the other three experimental moments (M1, M2 and M3). Regarding spinal column position, M0 scored lower than M3 and M4. In terms of attention to the environment, M0 scored lower than the other experimental moments (M1, M2, M3 and M4). In terms of response to approach, M0 scored lower than M2 and M3. With regard to the attention to management parameter, M0 scored lower than M2, M3 and M4. M1 also scored lower than M3. With regard to food intake, M0 scored lower than M2, M3 and M4. With regard to the total score for all the parameters on the pain scale, M0 had a lower score compared to the three experimental moments: M2, M3 and M4. In addition, M1 was lower than M3. And M3 had a higher score than M4. Activity in the monitoring collars was higher in M0 than in M2. Plasma cortisol levels were lower in M0 than in M1, M2 and M3. According to the results, we can conclude that the intramammary and transrectal application of ozone associated with management has the potential to generate painful and stressful sensations in Holstein cows. Furthermore, the application of ozone to healthy intramammary teats caused greater discomfort than intramammary application to teats affected by subclinical mastitis.

Keywords: Cattle; Cortisol; Pain; Transrectal; Parameters.

HIGHLIGHTS

- Diferentes formas de aplicação do ozônio alteram parâmetros da escala de dor.
- Distintas formas de aplicação do ozônio alteram teores de cortisol.
- O ozônio causa alterações comportamentais e plasmáticas que são sugestivas de dor e estresse.

INTRODUÇÃO

A bovinocultura de leite é um importante ramo do agronegócio e possui grande relevância socioeconômica. O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, com mais de 214,7 milhões de animais. Atualmente é considerado o terceiro maior produtor de

leite com produção estimada de 33.490.810 toneladas de litros, perdendo apenas para Estados Unidos e Índia (FAO, 2019).

A produção animal é constituída basicamente por três pilares principais que determinam a produtividade e qualidade dos produtos que são: genética, nutrição e sanidade. Em relação à sanidade, o bem-estar animal e observação de comportamento natural são pontos significativos (KILGOUR, 2012).

A dor em grandes animais tem sido negligenciada ao longo dos anos. Historicamente, como presas, os bovinos eram fonte de alimento para predadores. Seus traços comportamentais de fuga foram herdados geneticamente dos seus ancestrais selvagens e ainda estão presentes quando falamos em comportamento de expressão de dor (OLIVEIRA, *et al.*, 2014).

A observação do comportamento facial e corporal é utilizada para medir a sensação dolorosa em animais de produção (TRINDADE; OLIVEIRA; PARANHOS, 2018). De acordo com a literatura, a análise de expressões comportamentais e faciais podem ser utilizadas como ferramenta não invasiva, indolor, altamente aplicável dentro das propriedades de produção leiteira e de baixo custo para a avaliação de dor (MULLER *et al.*, 2019).

O estresse está relacionado a fatores que alteram ou ameaçam a homeostase do organismo gerando assim um desequilíbrio físico, emocional ou psicológico. O cortisol sanguíneo na bovinocultura de leite é utilizado como uma técnica laboratorial para quantificar situações de estresse e dor (BRISTW; HOLMES, 2007).

Outra ferramenta que pode ser utilizada para monitoramento de rebanho, são os sensores comportamentais “coleiras” que trazem parâmetros como, o tempo em estação e ócio que quando estão alterados podem ser sugestivos de situações estressantes que o animal foi submetido (BARRETO *et al.*, 2022).

Quando adentramos o tema bem-estar em animais de produção existe interesse em identificar e descrever indicadores fisiológicos que exponham os animais a respostas aos estressores. É necessário que haja um equilíbrio entre a produção animal sustentável e desenvolvimento de novas técnicas (BRITO *et al.*, 2020).

O desconforto animal não deve ser normalizado, por isso discussões éticas vêm tendo destaque entre consumidores, produtores e médicos veterinários. O tema dor e estresse em animais de produção tem sido uma das prioridades quando pensamos em implementar novos manejos nas propriedades (BERGHOF; POPPE; MULDER, 2019).

A ozonioterapia é uma terapia integrativa relativamente nova quando adentramos na bovinocultura de leite. O ozônio (O³) é um gás que quimicamente, é constituído por três

átomos de oxigênio identificados pela união de uma molécula de oxigênio com um átomo (ARÉVALO, *et al.*, 2021).

O ozônio age diretamente no sistema antioxidante gerando uma resistência antagonista ao estresse oxidativo podendo ser considerado um pró-fármaco porque os seus subprodutos geram efeitos biológicos (INAL *et al.*, 2011).

O ozônio pode ser aplicado nos bovinos através de insuflação com sondas de polietileno de forma intramamária ou transretal (SCIORSCI *et al.*, 2020). A aplicação pode ser feita de forma tópica com exposição do ozônio temporariamente em um sistema fechado com o auxílio de um “*bag*”, muito utilizado para tratamento de feridas abertas, úlceras e lesões em membros (FLORES; GAYON, 2019).

Este trabalho traz como ineditismo o fato de estudar parâmetros de uma escala de dor, coleiras de monitoramento e teores de cortisol em vacas leiteiras analisando alterações que podem ser associadas a dor e padrões estressores para uma terapia integrativa que é nova dentro das propriedades leiteiras. Observando como o manejo específico de aplicação intramamária e transretal de ozônio alteram o comportamento de bovinos.

Dentro deste contexto, o presente estudo tem por objetivo avaliar mediante parâmetros de escala de dor, de coleiras de monitoramento e dos teores de cortisol, se o manejo e a forma de aplicação intramamária e transretal de ozônio causam estímulos estressantes e dolorosos em vacas holandesas. Além de avaliar se a aplicação intramamária em teto inflamado causa maior estresse ou sensação dolorosa do que a aplicação em teto hígido.

MATERIAIS E MÉTODOS

Comitê de ética

O presente estudo foi submetido e aprovado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Fronteira Sul CEUA-UFFS sob protocolo número: 1804050423.

Animais

A pesquisa foi executada em fazenda de modelo *Free stall* localizada no município Salto do Lontra-PR (25°47'40.2"S 53°19'36.9"W) entre os meses de junho e julho de 2023. Para o estudo foram utilizadas 19 vacas leiteiras múltíparas da raça Holandesa, com 3 a 5 anos de idade e peso entre 300 e 600kg. As vacas foram alimentadas com a seguinte dieta (valores

referentes à dieta total animal/ dia): 31 kg de silagem de milho, 9 kg de ração 22%, 2 kg de farelo de soja, 2.6 kg de casquinha de soja, 3.2 kg de pré secado, 2.2 kg de caroço de algodão, 1 kg de milho moído entre outros suplementos, tamponantes, minerais e água *ad libitum*.

Crítérios de inclusão e exclusão dos animais

Para a inclusão no experimento, os animais foram submetidos de forma individual ao *California Mastitis Test* (CMT) para selecionar aqueles que apresentaram um quarto mamário hígido e um quarto com inflamação oriunda de uma mastite subclínica. Considerando a reação formada pela viscosidade sendo interpretada como resultado negativo, traços (suspeito), grau 1 (fracamente positiva), grau 2 (positiva) e grau 3 (fortemente positivo) (SCHALM; NOORLANDER., 1957).

Após realização do CMT uma segunda triagem com coleta de CCS automático foi feita para confirmar o diagnóstico de mastite subclínica onde foi considerado como vacas hígdas valores (abaixo de 200.000 céls/ml) e animais com inflamação da glândula mamária (acima de 200.000 céls /ml).

Para a inclusão no experimento, os animais foram submetidos de forma individual a várias avaliações. Foram analisadas fichas clínicas da propriedade para avaliar se o animal sofreu alguma injúria nos últimos três meses. O peso foi determinado mediante uso de fita de pesagem e a idade, raça e número de partos foram coletados nas fichas de histórico do animal na propriedade.

Na saída da sala de ordenha avaliou-se o escore de locomoção dos animais (escala:1-5) (SPRECHER; HOSPEDARIA; KANEENE., 1997), bem como o escore de condição corporal (escala: 1-5) (BRAUN *et al.* , 1986). Durante o período de alimentação pós ordenha as vacas também foram avaliadas quanto ao escore de fezes (escala:1-5) (ZAAIJER; KREMER; NOORDHUIZEN., 2001).

Como critérios de inclusão, o animal deveria apresentar no mínimo um quarto mamário hígido e um quarto inflamado (oriundo de uma mastite subclínica), não apresentar nenhuma enfermidade além da mastite subclínica no período mínimo de três meses. Ser múltípara, da raça Holandesa, ter idade de 3 a 5 anos, peso médio de 300 a 600 Kg, estar produzindo média de 10 a 40 litros, não estar no período reprodutivo (ovulação ou em estro), ter escore de locomoção normal (1), escore de fezes normal (1 e 2 aceitável para vacas em lactação) e escore de condição corporal (3,0) (BRAUN *et al.*, 1986).

Qualquer animal que não se encaixasse nos padrões de inclusão, seja por apresentar enfermidade ou estarem em período seco ou pré-parto, foram excluídos do estudo.

Delineamento experimental

Com o objetivo de avaliar por meio de escala de dor, do comportamento de atividade e de ócio e dos teores de cortisol plasmático, se o manejo e a forma de aplicação intramamária e transretal de ozônio causam estímulos de estresse e de sensação dolorosa, as 19 vacas holandesas selecionadas para o estudo foram submetidas ao protocolo experimental que desenvolveu-se em cinco momentos distintos, no mesmo animal, com intervalo de 48 horas resultando em 95 amostras coletadas em cada técnica de avaliação.

Os momentos experimentais dividiram-se em: M0 - momento do animal em repouso; M1 - momento onde ocorreu a simulação do manejo de aplicação intramamária com introdução da sonda de polietileno nº 6, mas, sem aplicação de nenhuma substância; M2 - aplicação intramamária de ozônio em quarto mamário hígido; M3 - aplicação intramamária de ozônio em quarto mamário inflamado; M4 - aplicação de ozônio transretal.

A dosagem de 35µg/ml de ozônio foi utilizada para aplicação na glândula mamária hígida, inflamada e transretal (dose recomendada pelo fabricante aparelho e descrita por Lillo *et al.*,2022). Para a aplicação do ozônio de forma segura e atóxica, o gás produzido por aparelho gerador de ozônio (OZONEVET®) foi retirado com auxílio de seringa estéril de 60ml. Posteriormente, a seringa foi acoplada a sonda de polietileno estéril nº 06 (Medsonda®). e o ozônio então foi aplicado por via intramamária ou transretal. Em ambas as vias o ozônio foi liberado gradualmente por um minuto. As aplicações foram realizadas pelo período da manhã.

Para a aplicação do ozônio via intramamária, o teto foi higienizado com gaze embebida em álcool 70%, e durante todo o procedimento utilizou-se luvas estéreis para minimizar a contaminação do canal durante a introdução da sonda. Antes da aplicação de ozônio por via transretal, com auxílio de luva de palpação, realizou-se a remoção das fezes do canal retal com posterior limpeza da região perianal. Durante todos os momentos experimentais, o animal encontrou-se em posição ortostática (estação) contido em um canzil com o uso do brete. A parte laboratorial foi realizada nos laboratórios da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU).

Escala de dor

Os dados para a escala de dor foram coletados com o auxílio de uma câmera fotográfica de 50 *megapixels* que registrou todos os momentos de manipulação e manejo para as aplicações. A gravação começou no exato momento que a manipulação da vaca selecionada iniciou. Em uma planilha, o momento de introdução da sonda foi registrado para determinarmos as reações que o bovino expressou no exato momento da introdução da sonda e aplicação do ozônio.

Após a finalização do manejo o colaborador ficou registrando o pós-manejo. Os vídeos eram gravados por 10 minutos em média. O colaborador gravou o vídeo através de uma abertura em estrutura feita com lona preta para não alterar o comportamento dos animais com sua presença. A estrutura foi colocada a 10 metros de distância do local onde estava ocorrendo a manipulação animal. Imediatamente após a aplicação os animais foram liberados para avaliação dos mesmos em movimento. Foram gravados 5 vídeos de cada animal, totalizando 95 gravações.

Para a avaliação foi utilizada uma escala de dor modificada de dois estudos que apresentaram escalas de dor agudas certificadas para a espécie bovina: a da Unesp-Botucatu (OLIVEIRA, *et al.*, 2014) e a *Cow Pain Scale* (GLEERUP *et. al.*, 2015). Essa escala foi avaliada pela pontuação onde o zero refletia normalidade e o um ou dois, as alterações relacionadas à dor, com pontuação máxima de 16 pontos.

Quadro 1: Escala de dor para vacas de leite modificadas com padrões de comportamento facial e corporal incluídos no estudo e suas respectivas alterações conforme pontuação:

Pontuação:	0	1	2
Posição da cabeça:	Acima da coluna vertebral.	No nível da coluna vertebral.	Baixo da linha da coluna vertebral.
Posição das orelhas:	Ambas as orelhas para frente ou uma orelha para frente ou para trás e a outra ouvindo.	Orelhas para trás apresentando movimentos assimétricos das orelhas. Ambas as orelhas para trás ou movendo-se em direções diferentes (não para frente ou para trás).	Orelhas de cordeiro Ambas as orelhas para os lados são mais baixas que o normal. O pavilhão auricular ligeiramente baixo e para trás.

Expressão facial:	Olhar atento/neutro A vaca está atenta, focada em uma tarefa (comer ou ruminar). Sem alterações faciais.	Expressão distraída: Olhar retraído, distraído não está focado em uma tarefa. Com leves traços de alterações faciais.	Expressão tensa/aparência tensa. Olhar: preocupado, a tensão dos músculos acima dos olhos pode ser vista como "linhas de sulco" e franzidos acima das narinas. Músculos faciais: tensão dos músculos faciais na lateral da cabeça. Focinho: narinas tensas, as narinas podem estar dilatadas e pode haver 'linhas' acima das narinas. Há aumento do tônus dos lábios.
Posição da coluna vertebral:	Normal.	Coluna levemente arqueada.	Coluna no máximo de arqueamento.
Atenção ao ambiente:	Ativa e atenta aos estímulos ambientais táteis, visuais e sonoros. Está comendo, ruminando e procurando contato/curiosa.	Quieta/deprimida A vaca não está ativa, não está comendo, ruminando ou procurando contato visual.	Apática não reage aos estímulos ambientais táteis, visuais e sonoros. Não está comendo, ruminando e evitando contato visual.
Resposta à aproximação:	Olha para o observador, cabeça erguida, orelhas voltadas para frente ou ocupado com alguma atividade (comendo ou ruminado).	Olha para o observador, orelhas não voltadas para frente, tenta sair quando é manejada.	Não olha para o observador, cabeça baixa, orelhas estão voltadas para baixo.
Atenção ao manejo:	Não olha para os manejadores.	Olha para os manejadores.	Olha e intervém no manejo que está sendo realizado.
Ingestão de alimento:	Normorexia e/ou ruminação presente.	Hiporexia.	Anorexia.

Adaptada de (OLIVEIRA, *et al.*, 2014); (GLEERUP *et. al.*, 2015);

Após a gravação os vídeos foram armazenados em pastas e depois de um mês das suas gravações os mesmos foram enviados para dois observadores às cegas de forma aleatória (randomizado) para observação das alterações e avaliação da pontuação para cada comportamento nas situações determinada pelos momentos (M0, M1, M2, M3 e M4). Noventa e cinco vídeos foram analisados.

4.4 Cortisol

Após os animais serem identificados e submetidos ao manejo de aplicação de cada determinado momento os bovinos foram submetidos a uma coleta de sangue para determinação dos teores de cortisol sanguíneo. Noventa e cinco amostras de sangue foram colhidas em tubo a vácuo com ativador de coágulo (BD Vacutainer®) de 10 ml por punção da veia coccígea mediana. Os mesmos foram coletados e armazenados em caixas térmicas com blocos de gelo reutilizáveis e transportados até o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da UFFS.

As amostras de sangue total foram armazenadas em forma de soro: o processamento teve início com a centrifugação das amostras de sangue total por 10 minutos a uma rotação de 5000 rpm depois do processo de centrifugação ocorre a retração do coágulo e a obter do soro que foi retirado com auxílio de pipetador de 1000 uL e armazenado em eppendorfs de 2 ml em um freezer -20°C dentro das respectivas caixas identificada até o momento de processamento.

Os teores de cortisol das amostras foram quantificados por meio do kit Accu Bind ELISA Microwells Cortisol Test System Monobind® de acordo com a metodologia do fabricante (FOSTER; DUNN, 1974). Uma vaca de leiteira em situação de repouso apresenta teores de cortisol de $0,05 \pm 1,80$ ng/ml quando os teores forem superiores à 1,80 ng/ml ela estará sofrendo uma situação estressante (BRISTW; HOLMES, 2007).

4.5 Coleiras de monitoramento da CowMed

Dados como a atividade e ócio das vacas leiteiras foram coletados antes, durante e após os momentos experimentais em um período de 24 horas. Os animais foram monitorados através dos colares eletrônicos C-TECH Chipinside®, em conexão com o software CowMed®, que captura os dados e realiza os registros com intervalos de uma hora. Os sensores das coleiras possuem um acelerômetro que mede parâmetros de ócio e atividade.

O sistema é composto pelo C-Reader e pelo software de gerenciamento, que geram padrões comportamentais para o rebanho e de forma individual para cada animal. Os dados avaliados foram coletados do mesmo animal em todos os momentos, assim conseguindo detectar mudanças sutis de comportamento que podem ser relacionadas com situações de estresse e dor. Todos os dados foram tabulados e comparados entre si para obtenção dos resultados.

4.6 Análise dos dados

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e randomizado. Todos os dados analisados eram quantitativos e foram coletados e digitalizados em planilhas do Excel e analisados através do software estatístico *Graphpad Prism* na versão 9.5.1. Para a determinação da distribuição dos dados foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Todos os dados foram pareados, ou seja, tem relação entre si. As variáveis paramétricas foram descritas por meio de média e desvio padrão e analisadas por meio de *One Way* (ANOVA)

seguido pelo teste de comparação de médias de Tukey. As variáveis não paramétricas foram descritas em medianas e intervalos interquartis (25% a 75%) e avaliadas por meio do teste de Friedman seguido pelo teste de comparação de médias de Dunn. O nível de significância foi considerado $p < 0,05$.

RESULTADOS

Os dados estão apresentados em tabelas e figuras. Os parâmetros referentes à escala de dor podem ser visualizados na Tabela 1, Figura 1, 2 e 3.

Tabela 1. Valores de mediana, intervalos interquartis (25% e 75%) e valores de p de parâmetros da escala de dor de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal).

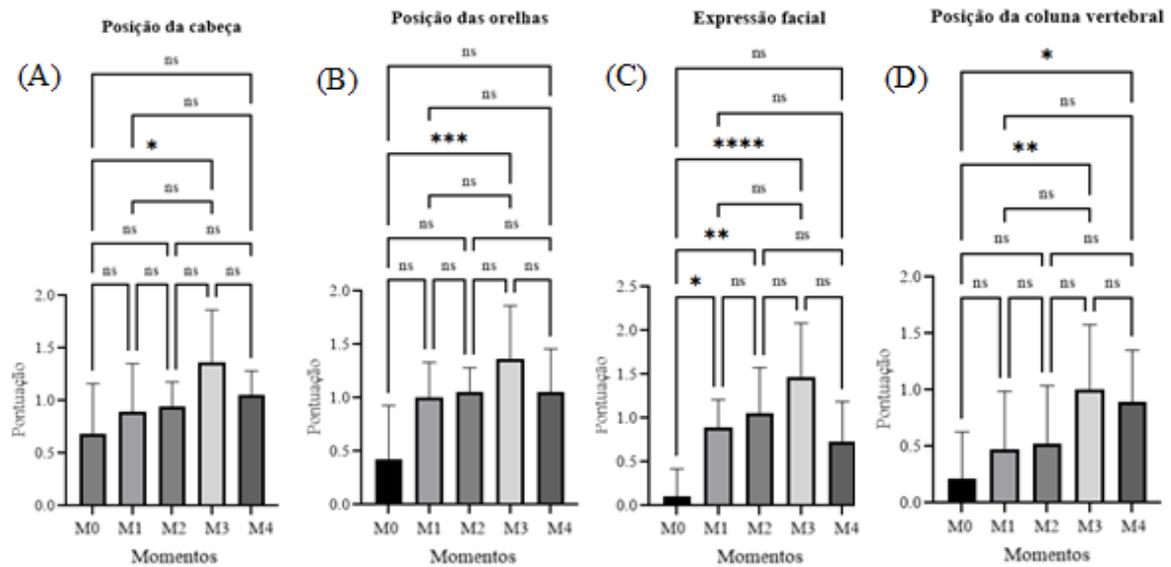
Parâmetros:	M0	M1	M2	M3	M4	Valor de p :
Posição da cabeça	1 (0-1) ^A	1 (1-1) ^{AB}	1 (1-1) ^{AB}	1 (1-2) ^B	1 (1-1) ^{AB}	<0,0001
Posição das orelhas	0 (0-1) ^A	1 (1-1) ^{AB}	1 (1-1) ^{AB}	1(1-2) ^B	1 (1-1) ^{AB}	<0,0001
Expressão facial	0 (0-0) ^A	1 (1-1) ^B	1 (1-1) ^B	2 (1-2) ^B	1 (0-1) ^{AB}	<0,0001
Posição da coluna vertebral	0 (0-0) ^A	0 (0-1) ^{AB}	1 (0-1) ^{AB}	1 (1-1) ^B	1 (1-1) ^B	<0,0001
Atenção ao ambiente	0 (0-0) ^B	1 (0-1) ^A	1 (0-1) ^A	1 (1-1) ^A	1 (0-1) ^A	<0,0001
Resposta à aproximação	0 (0-0) ^A	1 (0-1) ^{AB}	1 (1-1) ^B	1 (1-1) ^B	1 (0-1) ^{AB}	<0,0001
Atenção ao manejo	0(0-1) ^B	1(0-1) ^{BC}	1(1-2) ^{AC}	2 (1-2) ^A	1(1-2) ^{AC}	<0,0001
Ingestão de alimentos	0 (0-0) ^A	1 (0-1) ^{AB}	1 (1-1) ^B	1 (1-1) ^B	1 (0-1) ^B	<0,0001
Valor total da escala	2 (1-2) ^{BD}	7 (5-8) ^{CDE}	7 (6-9) ^{ACE}	10 (8-11) ^A	8 (4-9) ^E	<0,0001

Letras maiúsculas distintas na mesma linha denotam diferenças entre os momentos. Nível de significância de 5%.

Quanto à posição da cabeça os animais no M0 apresentaram pontuação menor em relação ao M3 ($p \leq 0,0147$) (Tabela 1 e Figura 1A). Referente ao parâmetro de posição das orelhas observamos que o M0 diferiu do M3 ($p \leq 0,0005$) que expressou pontuação aumentada (Tabela 1 e Figura 1B).

Em relação à expressão facial o M0 expressou pontuação menor que os outros três momentos experimentais: M1 ($p \leq 0,0103$), M2 ($p \leq 0,0012$) e M3 ($p \leq 0,0001$) (Tabela 1 e Figura 1C). Quanto à posição da coluna vertebral animais no M0 apresentaram menor pontuação em relação ao M3 ($p \leq 0,0029$) e o M4 ($p \leq 0,0208$) (Tabela 1 e Figura 1D).

Figura 1. Valores dos padrões de comportamento facial e corporal da escala de dor: Posição da cabeça (A), Posição das orelhas (B), Expressão facial (C) e Posição da coluna vertebral (D) em vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). Figura 1 (A) expressou diferença entre os momentos experimentais M0 e M3* ($p \leq 0,0147$). Figura 1 (B) demonstrou diferença entre o M0 e M3*** ($p \leq 0,0005$). Figura 1 (C) apresentou diferença entre os momentos experimentais M0 e M1* ($p \leq 0,0103$); M0 e M2** ($p \leq 0,0012$); M0 e M3**** ($p \leq 0,0001$). Figura 1 (D) demonstrou diferença entre o M0 e M3** ($p \leq 0,0029$); M0 e M4* ($p \leq 0,0208$). O ns expressa que não houve diferença entre os momentos experimentais ($p > 0,05$).

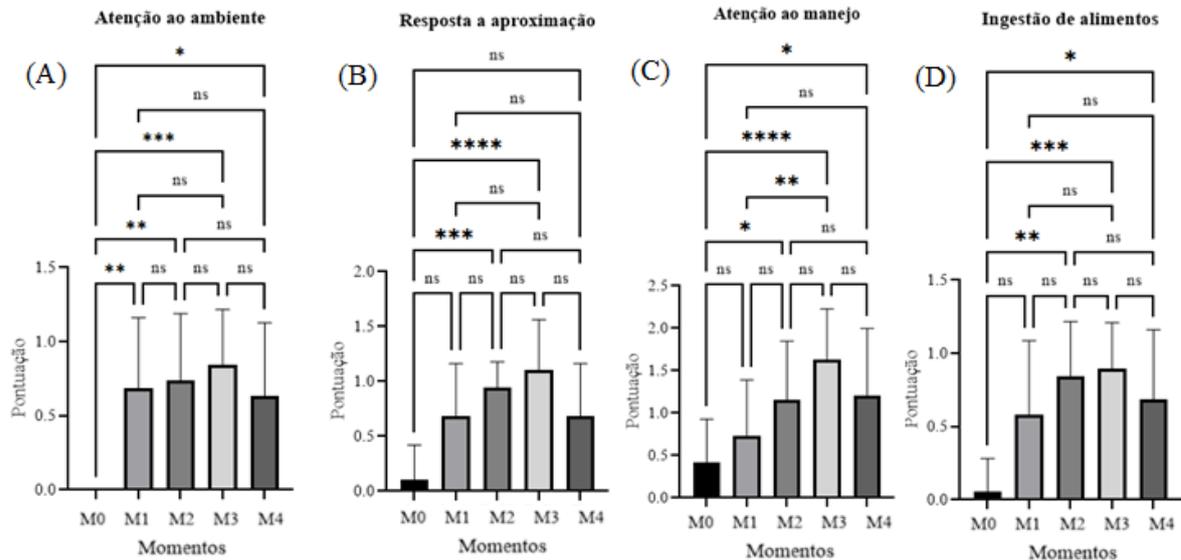


No parâmetro de atenção ao ambiente observamos que o M0 apresentou pontuação menor em relação aos demais momentos experimentais: M1 ($p \leq 0,0085$), M2 ($p \leq 0,0033$), M3 ($p \leq 0,0004$) e M4 ($p \leq 0,0208$) (Tabela 1 e Figura 2A). Em relação ao parâmetro resposta à aproximação o M0 teve menor pontuação quando comparado ao M2 ($p \leq 0,0005$) e M3 ($p \leq 0,0001$) (Tabela 1 e Figura 2B).

Respectivo ao parâmetro atenção ao manejo o M0 apresentou pontuação inferior aos seguintes momentos: M2 ($p \leq 0,0175$), M3 ($p \leq 0,0001$), M4 ($p \leq 0,0175$) (Tabela 1 e Figura 2C). Ademais o M1 foi menor que M3 ($p \leq 0,0085$). Quanto à ingestão de alimentos o M0 expressou pontuação menor em relação ao M2 ($p \leq 0,0012$), M3 ($p \leq 0,0004$) e M4 ($p \leq 0,0208$) (Tabela 1 e Figura 2D).

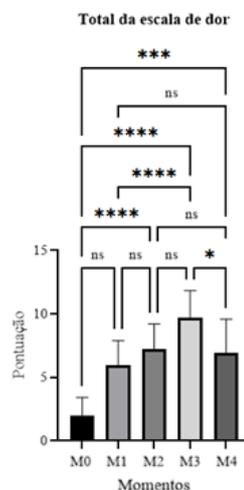
Figura 2. Diferenças dos padrões de resposta a estímulos externos e comportamento da escala de dor: Atenção ao ambiente (A), Resposta a aproximação (B), Atenção ao manejo (C) e Ingestão de alimentos (D) em vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2

(aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). Figura 2 (A) expressou diferença entre M0 e M1** ($p \leq 0,0085$); M0 x M2** ($p \leq 0,0033$); M0 e M3*** ($p \leq 0,0004$); M0 e M4* ($p \leq 0,0208$). Figura 2 (B) demonstrou diferença entre o M0 e M2*** ($p \leq 0,0005$); M0 e M3**** ($p \leq 0,0001$). Figura 2 (C) apresentou diferença entre M0 e M2* ($p \leq 0,0175$); M0 e M3**** ($p \leq 0,0001$); M1 e M3** ($p \leq 0,0085$); M0 e M4* ($p \leq 0,0175$). Figura 2 (D) demonstrou diferença entre o M0 e M2** ($p \leq 0,0012$); M0 e M3*** ($p \leq 0,0004$); M0 e M4* ($p \leq 0,0208$). O ns expressa que não houve diferença entre os momentos experimentais ($p > 0.05$).



Quando observamos a pontuação total de todos os parâmetros da escala de dor o M0 apresentou pontuação menor em relação à três momentos experimentais: M2 ($p \leq 0,0001$), M3 ($p \leq 0,0001$) e M4 ($p \leq 0,0001$). Ademais, o M1 foi menor que o M3 ($p \leq 0,0001$). E o M3 apresentou pontuação superior ao M4 ($p \leq 0,0478$) (Tabela 1 e Figura 3).

Figura 3. Diferenças na pontuação total de todos os parâmetros da escala de dor em vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). A figura intitulada total da escala de dor expressou diferença entre o M0 e M2**** ($p \leq 0,0001$); M0 e M3**** ($p \leq 0,0001$); M0 e M4*** ($p \leq 0,0001$); M1 e M3**** ($p \leq 0,0001$) M3 e M4* ($p \leq 0,0478$). O ns expressa que não houve diferença entre os momentos experimentais ($p > 0.05$).



Os dados acerca do cortisol plasmático de vacas holandesas nos distintos momentos experimentais estão apresentados na Tabela 2 e Figura 4.

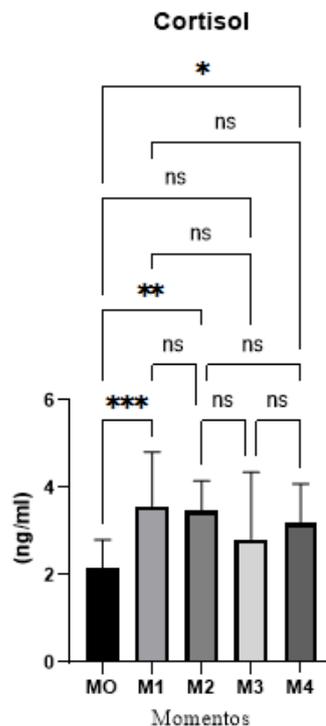
Tabela 2. Valores de mediana, intervalos interquartis (25% e 75%) e valor de *p* de dados referentes aos teores de cortisol plasmático de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal).

Parâmetro:	M0	M1	M2	M3	M4	Valor de <i>p</i> :
Cortisol*:	2,14(1,72-2,77) ^B	3,44 (2,74-3,95) ^{AC}	3,33(2,95 - 4,10) ^{AC}	2,78(1,73-3,10) ^{BC}	2,99(2,40-4,00) ^{AC}	0,0002

Letras maiúsculas distintas na mesma linha denotam diferenças entre os momentos. Nível de significância de 5%. * (ng/ml).

Os teores de cortisol plasmático foram menores no M0 em relação ao M1($p \leq 0,0006$), M2 ($p \leq 0,0014$) e M4 ($p \leq 0,0365$) (Figura 4). Não houve diferença entre o M0 e o M3 ($p > 0,05$).

Figura 4. Diferenças nos teores de cortisol sanguíneo em vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). A figura intitulada cortisol expressou diferença entre o M0 e M1*** ($p \leq 0,0006$); M0 e M2** ($p \leq 0,0014$); M0 e M4* ($p \leq 0,0365$). O ns expressa que não houve diferença entre os momentos experimentais ($p > 0,05$).



Os dados referentes às coleiras de monitoramento de vacas holandesas nos distintos momentos experimentais podem ser visualizados nas Tabelas 3 e 4 e Figura 5.

Tabela 3. Valores de mediana, intervalos interquartis (25% e 75%), média, desvio padrão e valores de p de dados referentes ao parâmetro de atividade (tempo em estação) extraídos das coleiras de monitoramento de vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). Valores expressos em minutos.

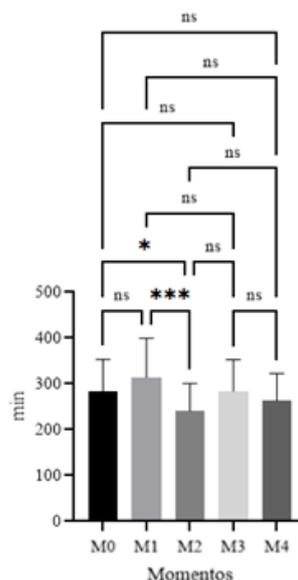
Parâmetro:	M0	M1	M2	M3	M4	Valor de p :
Tempo em estação dia antes	290 (228-370) ^A	260 (214-355) ^A	261 (222-320) ^A	268 (241-346) ^A	308 (248-381) ^A	0,7231
Tempo em estação durante o experimento	264 (239-310) ^A	308 (241-370) ^{AB}	248 (181-301) ^B	290 (216-346) ^{AB}	259 (227-313) ^{AB}	0,001
Tempo em estação dia após	270,4±43,34 ^A	286,6±70,50 ^A	260,1±71,19 ^A	310,8±80,13 ^A	258,1±65,85 ^A	0,6541

Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças entre os momentos.*As variáveis não paramétricas (tempo em estação dia antes e tempo em estação dia durante o experimento) foram descritas por medianas e intervalos interquartis (25% a 75%) e a variável tempo em estação dia após, por ser paramétrica, foi descrita por valores médios e desvio padrão. O nível de significância foi de 5%.

Não houve diferença entre momentos em relação ao tempo em estação um dia antes do experimento e um dia após o estudo ($p>0,05$). No entanto, o M0 apresentou maior tempo em estação durante o experimento diferindo do M2 ($p\leq 0,0293$). Ademais o M1 apresentou maior tempo em estação durante o experimento comparado ao M2 ($p\leq 0,0008$) como podemos observar na Figura 5.

Figura 5. Diferenças na atividade (tempo em estação) em vacas holandesas submetidas a distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto mamário); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). A figura intitulada tempo em estação durante o experimento expressou diferença entre os momentos experimentais M0 e M3* ($p\leq 0,0293$); M1 e M2*** ($p\leq 0,0008$). O ns expressa que não houve diferença entre os momentos experimentais ($p> 0,05$).

Tempo em estação durante o experimento



Referente aos dados de ócio antes, durante e após o experimento os mesmos não diferiram entre si como podemos observar na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de mediana, intervalos interquartis (25% e 75%) e valores de *p* de dados referentes ao parâmetro de ócio extraídos das coleiras de monitoramento de vacas holandesas submetidas à distintos momentos experimentais: M0 (repouso); M1 (introdução de sonda uretral em teto); M2 (aplicação de ozônio em teto intramamário hígido); M3 (aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado) e M4 (aplicação de ozônio transretal). Valores expressos em minutos.

Parâmetros:	M0	M1	M2	M3	M4	Valor de <i>p</i> :
Ócio dia antes	450 (365-528) ^A	460 (410-499) ^A	496 (410-550) ^A	514 (374-556) ^A	500 (437-519) ^A	0,2247
Ócio durante o experimento	431 (344-491) ^A	440 (381-500) ^A	490 (409-506) ^A	510 (406-525) ^A	490 (429-511) ^A	0,1813
Ócio dia após	490 (357-543) ^A	490 (426-517) ^A	490 (370-526) ^A	445 (364-504) ^A	425 (381-487) ^A	0,5612

Letras maiúsculas distintas na mesma linha denotam diferenças entre os momentos. Nível de significância de 5%.

DISCUSSÃO

A manifestação de dor nos bovinos não é vista de forma óbvia. Neste estudo podemos observar diversas alterações comportamentais relacionadas à expressão de sensações dolorosas e/ou estressantes. Quando analisamos diretamente a escala de dor aplicada neste estudo podemos notar que todos os parâmetros avaliados sofreram alterações em algum momento experimental. O que sugere que o ozônio aplicado por via intramamária e transretal pode causar dor aguda.

A análise de comportamento quando trabalhamos na bovinocultura de leite normalmente é relacionada a enfermidades graves. A comunidade científica geralmente relata ocorrência de dor em bovinos em condições extremamente dolorosas ou estressantes como peritonites, fraturas ósseas, artrites bacterianas e mastites clínicas agudas (HUXLEY; WHAY, 2006).

No entanto, neste estudo, observamos comportamentos que são sugestivos de dor aguda em bovinos no manejo de aplicação de ozônio. A ozonioterapia, apesar de ser uma terapia integrativa em crescente uso dentro da medicina veterinária, ainda é pouco utilizada nos rebanhos leiteiros. Tendo este estudo o ineditismo ser o único trabalho científico que analisou a dor em diferentes formas de aplicação de ozônio em bovinos.

A demonstração de dor de forma geral está relacionada com comportamentos de vocalização, com variações na postura normal das orelhas, com mudança da posição da coluna vertebral e da cabeça, com alteração do comportamento social, seja na atenção ao

ambiente ou em resposta a aproximação, e no olhar para área dolorida (O'CALLAGHAN *et al.*, 2003; SANDEM *et al.*, 2006; GLEERUP *et al.*, 2015; OLIVEIRA, *et al.*, 2014).

Ao avaliarmos os parâmetros na escala de dor observamos vários comportamentos sugestivos de sensação dolorosa. No parâmetro de atenção ao ambiente o M0 apresentou comportamento normal enquanto o M1, M2, M3 e M4 expressaram comportamentos como falta de ruminção, isolamento e quietude. Quanto a posição da cabeça e orelhas o M0 apresentou comportamento normal enquanto que no M3 os animais apresentaram a cabeça baixa e orelhas para trás e abaixadas. No parâmetro de expressão facial os animais no M0 apresentaram comportamento normal enquanto que no M1, M2 e M3 manifestaram narinas franzidas e sulcos musculares demonstrando uma expressão facial distraída e tensa.

Em outros parâmetros os animais também exibiram comportamentos que podem ser indicativos de dor. No parâmetro de resposta a aproximação os animais no M0 expressaram comportamento normal para a espécie enquanto no M2 e M3 tentaram fugir durante o manejo e não olhavam para o observador. Quanto ao parâmetro da posição da coluna vertebral os animais no M0 mantiveram-se em posicionamento normal da coluna enquanto no M3 e M4 apresentaram coluna levemente arqueada. Nos parâmetros de comportamento de ingestão de alimentos e atenção ao manejo o M0 apresentou comportamento normal para espécie enquanto o M2, M3 e M4 apresentaram hiporexia e olhar para o manejador.

Dentre os estudos realizados em animais, utilizando-se a ozonioterapia, Sumida; Matera e Hayashi (2023) compararam a aplicação subcutânea de 20 µg/mL de ozônio com eletroacupuntura em cães com doença de disco toracolombar. A dor foi mensurada através de *Dynamic Interactive Visual Analogic Scale (DIVAS)*. Como resultados foram observados que ambos os grupos: ozônio e eletroacupuntura foram eficazes para controle da dor e reabilitação motora.

Fuccio *et al.*, 2009 relataram a diminuição da dor neuropática em camundongos mediante única aplicação de ozônio por via subcutânea na dose de 90 µg/kg. Esse efeito foi atribuído a alteração e regulação dos genes pró-inflamatórios que são envolvidos na manutenção da alodinia. Importante ressaltar que os autores não utilizaram nenhuma metodologia relacionada à observação comportamental. Para a avaliação da dor neuropática utilizaram análises imunológicas e histopatológicas de tecidos dos animais.

Em 2018, Raeissadat *et al.*, realizaram aplicações de ozônio em uma concentração de 15 µg/mL em humanos que eram acometidos pela síndrome de dor miofascial. Os autores descreveram que uma única aplicação de ozônio teve a mesma eficácia de uma injeção de lidocaína para o controle de sensação dolorosa.

Em humanos existem alguns trabalhos que observaram o efeito analgésico e de controle da dor quanto a utilização do ozônio (ROCHE, *et al.*, 2017; FUCCIO, *et al.*, 2009; TARTARI, *et al.*, 2020).

Porém, em 2011, Borrelli avaliou o mecanismo de ação da ozonioterapia associado a dor em humanos para o tratamento de lombalgia e hérnia de disco. Foram utilizadas concentrações de ozônio que variaram de 18 a 25 $\mu\text{g/mL}$. de acordo com o autor os tratamentos iniciais de aplicação local, com concentrações acima de 20 $\mu\text{g/mL}$ causaram dor ao longo da aplicação. Depois de várias sessões o limite de dor aumenta, diminuindo a sensação dolorosa no momento de aplicação.

No entanto, quando observamos publicações dentro da medicina veterinária, principalmente na espécie bovina, não encontramos nenhum estudo que tenha determinado o mecanismo de ação relacionado à ozonioterapia ou analisou a dor em diferentes formas de aplicação de ozônio.

Os dados obtidos neste estudo quanto à análise de parâmetros relacionados a escala de dor foram indicativos de sensação dolorosa em diferentes formas de aplicação de ozônio. As diferenças nos resultados dos estudos podem ser explicadas por tratar-se de metodologias de aplicação e espécies diferentes. Um ponto importante é que o ozônio neste estudo entrou em contato com mucosas e não com a musculatura.

Ao analisarmos os dados experimentais do cortisol plasmático detectamos que os animais em repouso exibiram menores concentrações em relação aos momentos M1, M2 e M4. Também é importante observar que os valores desta variável bioquímica foram mais elevados quando os animais foram submetidos apenas ao manejo de introdução da sonda uretral intramamário (M1) em relação ao momento do repouso (M0). Tal fato pode estar atrelado ao manejo de forma isolada que pode ter causado estresse e desconforto.

Os teores mais elevados de cortisol no momento de aplicação de ozônio em teto intramamário hígido (M2) e por via transretal (M4), quando comparados ao momento de repouso (M0), é indicativo de que ocorreu estresse agudo pela associação do manejo de aplicação com o contato do ozônio nas mucosas dos bovinos.

Os teores de cortisol sanguíneo em bovinos leiteiros são disponibilizados de forma suplementar seguindo o ritmo circadiano. Já sabe-se que o cortisol está envolvido em diversos processos fisiológicos relacionados a condições adversas de bem-estar, dor e inflamação (BRUTO; WELLNITZ; BRUCKMAIER, 2015).

No entanto, os valores de cortisol foram semelhantes no momento de repouso (M0) e na aplicação de ozônio em teto intramamário inflamado (M3). Esse resultado pode ser

explicado pela diminuição da sensibilidade dos receptores de dor local na mucosa que se encontra alterada pela presença da inflamação causada pela mastite subclínica. Esta enfermidade comprovadamente causa uma diminuição do limiar térmico nociceptivo, ou seja, a capacidade da glândula mamária afetada encontra-se diminuída para perceber os estímulos dolorosos (PETERS; SILVEIRA; FISHER, 2015).

Quando ocorreu a mensuração dos dados através das coleiras de monitoramento observamos que o M0 apresentou maior tempo em estação (atividade) durante o experimento do que o M2, ou seja, quando ocorreu à introdução da sonda por via intramamária, com liberação de ozônio no teto hígido, o parâmetro de atividade encontrou-se menor do que quando o animal estava em repouso podendo esse achado ser indicativo de dor.

Ademais, o M1 apresentou maior tempo em estação durante o experimento quando comparado ao M2. Esse resultado é indicativo de que não apenas o manejo de introdução da sonda causa dor, mas a aplicação associada com o contato do ozônio com as mucosas também gera sensações dolorosas. Notasse que a dor causada nestes momentos pontuais é aguda, pois ocorreu alteração apenas no dia do experimento.

BARRETO *et al.*, 2022 realizaram um estudo utilizando coleiras de monitoramento para comparar o comportamento de bovinos de corte submetidos a dois sistemas de pastagem: o FS (pastagem a pleno sol) e ILPF (pastagem florestada). Dentre os parâmetros estudados os autores observaram que o FS apresentou maior atividade que o grupo ILPF. De acordo com os autores este resultado pode estar associado ao estresse.

Em outro estudo, BENAÏSSA *et al.*, (2017) utilizaram acelerômetros com o objetivo de classificar alguns tipos de comportamentos em vacas. Como resultado também observaram que quando os bovinos eram expostos a situações estressantes o ócio tendia a reduzir enquanto a atividade aumentava.

No entanto, os animais deste estudo apresentaram comportamento diferente, ou seja, demonstraram redução da atividade relacionada à dor. Durante o período experimental observamos que os dados referentes aos parâmetros de atividade e ócio apresentam-se dentro da conformidade para a espécie quando avaliado pelo tempo. Clinicamente bovinos saudáveis em situação de bem-estar apresentam três comportamentos principais: atividade, ócio e ruminância utilizados um total de oito horas para o desenvolvimento de cada um (GONZÁLES, 2021).

CONCLUSÃO

Mediante resultados é possível concluir que a aplicação de ozônio em teto intramamário hígido e inflamado ou por via transretal altera em algum nível parâmetros relacionados ao comportamento como: atenção ao ambiente, posição da cabeça, das orelhas e da coluna vertebral, expressão facial, resposta a aproximação, ingestão de alimentos e atenção ao manejo. E estes resultados estão associados a situações dolorosas e/ou estressantes. O ozônio associado ao manejo de administração altera comportamentos mensurados por observação visual em bovinos leiteiros.

Os teores de cortisol plasmático também obtidos durante a aplicação intramamária em teto hígido e transretal foram mais elevados. Ademais os teores de cortisol sanguíneo expressaram valores aumentados durante o momento manejo mostrando que o ozônio não causa dor ou estresse de forma isolada, mas, pela associação do manejo com a liberação e contato do ozônio com as mucosas saudável da glândula mamária e reto.

Este estudo observou que a aplicação de ozônio em teto hígido causa maiores alterações sugestivas de estresse e dor que a aplicação intramamária em teto acometido por mastite subclínica quando avaliado através dos teores de cortisol plasmático.

As coleiras de monitoramento apontaram alteração apenas na atividade do dia do experimento para o momento intramamária em teto hígido. Os parâmetros de ócio não foram alterados. Com esses resultados podemos observar que a dor causada pela aplicação é aguda.

Conclui-se que as formas de aplicação intramamária e retal de ozônio associados ao manejo tem potencial de gerar sensações dolorosas e estressantes em vacas leiteiras da raça holandesa.

REFERÊNCIAS

ARÉVALO, E. A. F; SILVA, D. F. D; GRABOSCHII, A. C. G., BRITO, J. V. S., ESCODRO, P. B. Ozonotherapy in the prevention and therapeutic of mastitis in dairy cows: Literature review Ozonoterapia en la prevención y terapéutica de mastitis en vacas lecheras: **Revisión de literatura. Research, Society and Development**, v. 10, n.3, 2021.

BARRETO, A.D.N., JUNIOR, W.B., PEZZOPANE, J.R.M., BERNARDI, A.C.D.C., PEDROSO, A.D.F., MARCONDES, C.R., JACINTHO, M.A.C., ROMANELLO, N., SOUSA, M.A.P.D., COSTA, L.N., GARCIA, A.R. Thermal comfort and behavior of beef cattle in pasture-based systems monitored by visual observation and electronic device. **Applied Animal Behaviour Science**. v.253, 2022.

BENAÏSSA, S. TUYTTENS, F.A.M., PLETS, D., PESSEMIER, T.D., TROGH, J., TANGHE, M., MARTENS, L., VANDAELE, L., NUFFEL, A.V., JOSEPH,

- O., SONCK, V. On the use of on-cow accelerometers for the classification of behaviours in dairy barns. **Research in Veterinary Science**, v. 125, p. 425–433, ago, 2017.
- BERGHOF, T.V.L., POPPE, M., MULDER, H.A. Oportunidades para melhorar a resiliência em programas de melhoramento animal. **Frente. Geneta**. 2019.
- BORRELLI, E. Mecanismo de ação da ozonioterapia no tratamento de disco hérnia e lombalgia. **Acta Neurochir**. v.108, pag. 123–125, 2011.
- BRAUN,R.K., DONOVAN,G.A., TRAN, T.Q. SHEARER, J.K., BLISS, E.L., WEBB,D.W., BEEDE,D.K., HARRIS, B. Body condition scoring as a herd management tool. **Compend. Contin. Educ. Pract. Vet**. v.8. pag. 62, 1986.
- BRISTW, D. J.; HOLMES, D. S. Níveis de cortisol e comportamentos relacionados à ansiedade em bovinos. **Fisiologia & comportamento** , v. 90, n. 4, pág. 626-628, 2007.
- BRITO, L.F., OLIVEIRA, H.R., MCCONN, B.R ,SCHINCKEL, A.B., ARRAZOLA, A., MARCHANT-FORDE, J.M., JOHNSON, J.S. Fenotipagem em larga escala do bem-estar pecuário em sistemas de produção comercial: uma nova fronteira na criação animal. **Fronteiras em Genética**, 2020.
- BRUTO,J.J., WELLNITZ,O., BRUCKMAIER, R.M. Secreção de cortisol em resposta a desafios metabólicos e inflamatórios em vacas leiteiras. **Journal of Animal Science**. v.93, 2015.
- FAO (food and agriculture organization of the united nations). **Produção animal**. 2019. disponível em: <http://www.fao.org/animal-production/en/>.
- FLORES,C. E., GAYON, A. S.G. Ozonotherapy for equine laminitis. **J. Ozone Ther**. v.3, pag.16–17, 2019.
- FOSTER, L., DUNN, R. Single antibody technique for radioimmunoassay of cortisol in unextracted serum or plasma. **Clin chem**, 1974.
- FUCCIO, C., LUONGO, C., CAPODANNO, P., GIORDANO, C., SCAFURO, MA, SINISCALCO, D., LETTIERI, B., ROSSI, F., MAIONE, S., BERRINO, L. Uma única injeção subcutânea de ozônio previne alodinia e diminui a superexpressão de caspases pró-inflamatórias no córtex orbitofrontal de camundongos neuropáticos . **EUR. J. Pharmacol**, 2009.
- GLEERUP, K.B.; ANDERSEN, P.H.; MUNKSGAARD, L.; FORKMAN, B. Pain evaluation in dairy cattle. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 171, p. 25-32, 2015.
- GONZÁLEZ, F, H, D. **A vaca leiteira do século 21: lições de metabolismo e nutrição**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, 2021.
- INAL, M., DOKUMACIOGLU, A., OZCELIK, E., UCAR, O. The effects of ozone therapy and coenzyme Q10 combination on oxidative stress markers in healthy subjects. **Ir. J. Med. Sci**. v.180, pag.703–707,2011.
- HUXLEY, J.N., WHAY, R.H. O que Atitudes atuais dos criadores de gado em relação à dor e ao uso de analgésicos em bovinos. **Veterinario. Gravando**, 2006.

KILGOUR, R. J. In pursuit of “normal”: A review of the behaviour of cattle at pasture. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 138, n. 1-2, p. 1-11, 2012.

MULLER, B.R., SORIANO, V.R., BELLIO, J.C.B., MOLENTO, C.F.M. Expressão facial de dor em bovinos Nelore e mestiços de corte. **J. Veterinário. Comporte-se**, 2019.

O'CALLAGHAN, K.A., CRIPPS, P.J., DOWNHAM, D.Y. Avaliação subjetiva e objetiva da dor e desconforto por claudicação em bovinos leiteiros. **Animal Welfare**, 2003.

OLIVEIRA, F.A.D. LUNA, S.P.L., AMARAL, J.B.D., RODRIGUES, K.A., SANT'ANNA, A.C., DAOLIO, M., BRONDANI, J.T. Validation of the UNESP-BOTUCATU unidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cattle. **BMC Veterinary Research**, 2014.

PETERS, M.D.M., SILVEIRA, B.I.D., FISHER, V. Impacto da mastite subclínica e clínica na sensibilidade à dor de vacas leiteiras. **Animal**, 2015.

RAEISSADAT, S.A., RAYEGANI, S.M., FOROGH, B., ABADI, P.H., MORIDNIA, M., DEHGOLAN, S.R. Comparação da eficácia da injeção de ozônio e lidocaína versus agulhamento seco em pacientes com síndrome de dor miofascial **J. Pain Res.** v.11, pag.111–117, 2018.

ROCHE, D. L., ROMO, R. M., MESTA, F., MATOS, H. Y., BARRIOS, J.M, MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G., AL-DALAIEN, S. M. O ozônio medicinal promove a fosforilação do Nrf2, reduzindo o estresse oxidativo e as citocinas pró-inflamatórias em pacientes com esclerose múltipla. **EUR. J. Pharmacol.** v.15, pag.148–154, 2017.

SANDEM, A.I., JANCZAK, A.M., SALTE, R., BRAASTAD, B.O. O uso do diazepam como validação farmacológica do branco dos olhos como indicador de estado emocional em vacas leiteiras **Apl. Anima. Comporte-se. Ciência**, 2006.

SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experiments and observation leading to development of California Mastitis Test. **JAVMA: Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.130, p.199-204, 1957.

SCIORSI, R. L.; LILLO, E.; OCCHIOGROSSO, L.; RIZZO, A. Ozone therapy in veterinary medicine: a review. **Research in veterinary science**, v. 130, p. 240-246, 2020.

SPRECHER, D.J., HOSPEDARIA, D.E., KANEENE, J.B. A lameness scoring system that uses posture and gait to predict dairy cattle reproductive performance. **Theriogenology**. v.47, pag.1179-1187, 1997.

SUMIDA, J.M., MATERA, J.M., HAYASHI, A.M. Comparação prospectiva randomizada, simples-cega, entre terapia com ozônio e eletroacupuntura para doença do disco toracolombar canina. **Pesquisa em Ciência Veterinária**. v.161, pág., 173-179, 2023.

TARTARI, A.P.S., MOREIRA, F.F., PEREIRA, M.C.S., CARRARO, E., CIDRAL-FILHO, F.J., SALGADO, A.I., KERPPERS, I.I. Efeito antiinflamatório da ozonioterapia em modelo experimental de artrite reumatóide. **Inflamação**. v.43, pag.985–993, 2020.

TRINDADE, P.H.E., OLIVEIRA, F. D. C., PARANHOS, D. C. M.J.R. Expressões básicas em cavalos: uma abordagem sobre os métodos de avaliação e as limitações de seu uso. **Rev. Acadêmica Ciência Anim**, 2018.

WEARY, D. M.; HUZZEY, J. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Board-invited review: Using behavior to predict and identify ill health in animals. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 2, p. 770–777, 1 fev, 2009.

ZAAIJER, D., KREMER, W.D.J., NOORDHUIZER, J.P.T.M. Dairy cow monitoring in relation to fertility performance. **Cattle Practice**, v. 9, n. 3, p. 205-210, 2001.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quando analisamos a fundo a literatura observamos que na área da medicina veterinária, especialmente de animais de produção, os trabalhos científicos relacionados com terapias integrativas como a ozonioterapia são escassos, ainda mais envolvendo observação comportamental, dor e variabilidade da frequência cardíaca. Esse estudo explorou uma lacuna inédita dentro da literatura que é a avaliação das variáveis acima citadas em vacas holandesas submetidas à diferentes formas de aplicação de ozônio.

Com isso também observamos como limitações a dificuldade em comparar os dados obtidos no estudo com trabalhos publicados. Uma vez que dentro da área de animais de produção os assuntos pesquisados neste estudo não foram explorados pela comunidade científica.

O ozônio como forma de tratamento de enfermidades veterinárias foi liberado a poucos anos. Há uma perspectiva positiva para o surgimento de novos estudos envolvendo esta molécula. Acreditamos que mais pesquisas sejam necessárias para avaliar o mecanismo de ação, os efeitos benéficos e os possíveis efeitos colaterais da ozonioterapia em bovinos.

O tema dor e bem-estar animal é muito debatido entre médicos veterinários, produtores e consumidores dos produtos derivados da indústria láctea. Os consumidores estão cada vez mais interessados em saber em quais condições os animais de produção estão sendo criados. Desejam ter conhecimento de como são tratados durante a sua vida produtiva e se são submetidos à manejos que incluem práticas de bem estar-animal. Sendo de suma importância a realização de trabalhos com o objetivo de avaliar se as terapias integrativas, quando aplicada nos bovinos, mantém as condições de bem-estar dos mesmos.

Com base neste estudo evidenciamos que a aplicação de ozônio por via intramamária e transretal altera diversos parâmetros da variabilidade da frequência e da escala de dor,

aumenta os teores de cortisol plasmático e aumenta a atividade de vacas leiteiras em lactação, sendo tais resultados sugestivos de dor e estresse.

Também observamos que a aplicação de ozônio em teto hígido apresenta alterações sugestivas de maior desconforto e dor que a aplicação intramamária em teto inflamado, quando analisamos os dados da variabilidade da frequência cardíaca, do cortisol plasmático e da atividade.

Conclui-se que as formas de aplicação intramamária e transretal de ozônio associada ao manejo tem potencial de gerar sensações dolorosas e estressantes em bovinos. Por tratar-se de um assunto atual, abrangente e não explorado, novos estudos devem ser desenvolvidos pela comunidade científica.

6. REFERÊNCIAS

ANDERSON, D. E; EDMONDSON, M. A. Prevention and management of surgical pain in cattle. **Vet clin n am-food a.** v. 29, , p. 157-84, 2013.

ANIL, S. S; ANIL, L; DEEN, J. Challenges of pain assessment in domestic animals. **J am vet med assoc.** p. 220-313, 2002.

ARÉVALO, E. A. F; SILVA, D. F. D; GRABOSCHII, A. C. G; BRITO, J. V. S; ESCODRO, P. B. Ozonotherapy in the prevention and therapeutic of mastitis in dairy cows: Literature review Ozonoterapia en la prevención y terapéutica de mastitis en vacas lecheras: **Revisión de literatura. Research, Society and Development**, v. 10, n.3, 2021.

BENAISSA, S., TUYTTENS, F. A.M., PLETS, D., PESSEMIER, T.D., TROGH, J., TANGHE, E., MARTENS, L., VANDAELE, L., NUFFEL, V.N., JESEPH, O., SONCK, B. On the use of on-cow accelerometers for the classification of behaviours in dairy barns. **Research in Veterinary Science**, v. 125, p. 425–433, ago, 2017.

BIDOLI, E. M. Y.; ERHARD, M. H.; DÖRING, D. Heart rate and heart rate variability in school dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 248, 1 mar, 2022.

BRISTW, D. J.; HOLMES, D. S. Níveis de cortisol e comportamentos relacionados à ansiedade em bovinos. **Fisiologia & comportamento** , v. 90, n. 4, pág. 626-628, 2007.

BROOM, D. M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, v. 142, n. 6, p. 524–526, nov, 1986.

BERGHOF, T.V.L., POPPE, M., MULDER, H.A. Oportunidades para melhorar a resiliência em programas de melhoramento animal. Frente. **Geneta**, 2019.

BORELL, V. E., LANGBEIN, J., DESPRÉS, G., HANSEN, S., LETERRIER, C., MARCHANT,F.J., MARCHANT, F. R., MINERO, M., MOHR, E., PRUNIER, A., VALANCE, D., VEISSIER, I. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of

cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals: a review. **Physiology and Behavior**. Pag. 293–316, 2007.

BRITO, L.F., OLIVEIRA, H.R., MCCONN, B.R., SCHINCKEL, A.B., ARRAZOLA, A., MARCHANT-FORDE, J.M., JOHNSON, J.S. Fenotipagem em larga escala do bem-estar pecuário em sistemas de produção comercial: uma nova fronteira na criação animal. **Fronteiras em Genética**, 2020.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Resolução nº 1364 de 22 de outubro de 2020. Diário Oficial da União, 2020.

CEBALLOS, M. C., Gois, K.C.R., SANTANNA, A.C., WEMELSFELDER, F.. Reliability of qualitative behavior assessment (QBA) versus methods with predefined behavioral categories to evaluate maternal protective behavior in dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 236, p. 105263, mar, 2021.

COLLIER, R.J.; RENQUIST, B. J.; XIAO, Y. A 100 year review: Stress physiology including heat stress. **J Dairy Sci**, 2017.

Department for Environment, Farming and Rural Affairs. FAWC report on stockmanship and farm animal welfare. <https://www.gov.uk/government/publications/fawc-report-on-stockmanship-and-farm-animal-welfare>, 2007.

FLORES, C. E., GAYON, A. S.G. Ozonotherapy for equine laminitis. **J. Ozone Ther.** v.3, pag.16–17, 2019.

FAO (food and agriculture organization of the united nations). **Produção animal**. 2019. disponível em: <http://www.fao.org/animal-production/en/>.

GLEERUP, K.B.; ANDERSEN, P.H.; MUNKSGAARD, L.; FORKMAN, B. Pain evaluation in dairy cattle. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 171, p. 25-32, 2015.

GONZÁLEZ, L.A.; TOLKAMP, B.J.; COEY, M.P.; FERRET, A.; KYRIAZAKIS, I. Changes in Feeding Behavior as Possible Indicators for the Automatic Monitoring of Health Disorders in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 3, p. 1017–1028, 1 mar, 2008.

GONZÁLEZ, F, H, D. A vaca leiteira do século 21: lições de metabolismo e nutrição. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária**, 2021.

GRANDIN, T. Animal welfare and society concerns finding the missing link. **Meat Science**, v. 98, n. 3, p. 461–469, 2014.

GRANT, R.J.; DANN, H.M.; WOOLPERT, M.E. Time required for adaptation of behavior, feed intake, and dietary digestibility in cattle. *Journal of Dairy Science*, v.98, suppl.2, p.312, 2015.

HEMSWORTH, P.H. Human-animal interactions in livestock production. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v. 81, pp. 185-198, 2003.

HEMSWORTH, P.H., BARNETT, J.L., COLEMAN, G, J., HANSEN, C. A study of the relationships between the attitudinal and behavioral profiles of stockpersons and the level of

fear of humans and reproductive performance of commercial pigs. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v. 23, pp. 301-314, 1989.

JONES, R.B. Reduction of the domestic chick's fear of humans by regular handling and related treatments. **Anim. Behav.** v. 46, pp. 991-998, 1993.

KILGOUR, R. J. In pursuit of “normal”: A review of the behaviour of cattle at pasture. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 138, n. 1-2, p. 1-11, 2012.

KUUSELA, T. Methodological aspects of heart rate variability analysis. Heart Rate Variability (HRV) SIGNAL Analysis. **Boca Raton FL: CRC Press**, 2013.

LING, T.; HERNANDEZ, J. M.; SORDILLO, L. M.; ABUELO, A. Maternal late-gestation metabolic stress is associated with changes in immune and metabolic responses of dairy calves. **J Dairy Sci**, 2018.

LORENA, S. E.R.S; LUNA, S.P.L; LASCELLES, B.D.X; CORRENTE, J.E. Attitude of brazilian veterinarians in the recognition and treatment of pain in horses and cattle. **VET ANAESTH ANALG.** v. 40. p.410-8, 2013.

LUCY, M. C., GARVERICK, H.A., SPIERS, D.E. Management Induced Stress in Dairy Cattle: Effects on Reproduction. **Encyclopedia of dairy sciences.** pág. 913-919, 2022.

MARTISKAINEN, P.; JÄRVINEN, M.; SKÖN, J.-P.; TIIRIKAINEN, J.; KOLEHMAINEN, M.; MONONEN, J.. Cow behaviour pattern recognition using a three-dimensional accelerometer and support vector machines. *Applied Animal Behaviour Science*, v.119, n.1-2, p.32-38, 2009.

MAVANGIRA, V.; SORDILLO, L. M. Role of lipid mediators in the regulation of oxidative stress and inflammatory responses in dairy cattle. **Res Vet Sci**, 2018.

NUNES, M. H. V.; PACHECO, A. D.; WAGATSUMA, J. T. Reconhecimento e avaliação da dor em bovinos: Revisão. **Pubvet**, v. 15, p. 181, 2020.

NUNES, R. B.; FERREIRA, C. F. X.; ABOIN, R. M.; DE DEUS, H. G.; SAITO, M. E.; YONEZAWA, L. A. Parâmetros eletrocardiográficos de novilhas da raça Jersey. **Archives of Veterinary Science**, v.19, n.4, p.17-23, 2014.

OLIVEIRA, F.A.D. LUNA, S.P.L., AMARAL, J.B.D., RODRIGUES, K.A., SANT'ANNA, A.C., DAOLIO, M., BRONDANI, J.T. Validation of the UNESP-BOTUCATU unidimensional composite pain scale for assessing postoperative pain in cattle. **BMC Veterinary Research**, 2014.

REITER, S., SATTLECKER, G., LIDAUER, L., KICKINGER, F., ÖHLSCHUSTER, M., AUER, W., IWERSEN, M. Evaluation of an ear-tag-based accelerometer for monitoring rumination in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 4, p. 3398–3411, 2018.

REMNANT J.G., TREMLETT A., HUXLEY J.N., HUDSON C.D. Clinical attitudes to pain and use of analgesia in cattle-Where are we 10-years on?. **Vet. Rec**, 2017.

- SCHIRMANN, K.; NÚRIA, C.; DANIEL, M. WEARY.; WOLFGANG, H.; MARIAN, A. G. V. K. Rumination and its relationship to feeding and lying behavior in Holstein dairy cows. *Journal of dairy science*, Champaign, v. 95, n. 6, p. 3212- 3217, 2012.
- SCIORSI, R. L.; LILLO, E.; OCCHIOGROSSO, L.; RIZZO, A. Ozone therapy in veterinary medicine: a review. **Research in veterinary science**, v. 130, p. 240-246, 2020.
- SEABROOK, M.F. A study to determine the herdsman's personality on milk yield. **Journal of the British Society for Agricultural Labour Science**, pp. 45-59, 1972.
- STYGAR, A.H.; GÓMEZ, Y.; BERTESELLI, G.V.; COSTA, E.D.; CANALI, E.; NIEMI, J.K.; LLONCH, P.; PASTELL, M. A. Systematic Review on Commercially Available and Validated Sensor Technologies for Welfare Assessment of Dairy Cattle. *Front. Veter. Sci.*, v. 8, p. 177, 2021.
- STEIN, P.K. Non-linear heart rate variability and risk stratification in cardiovascular disease. **Indian Pacing Electrophysiol**, 2015.
- SAFIAI, M.H., KASHIM, M.I.A., ISA, F.N.M., YUSOFF, A.F., JAMSARI, E.A., ZIN, D.M.M., 2018. Application of ozone therapy as an alternative treatment in Malaysia according to Islamic perspective. **Int. J. Civ. Eng. Technol.** v. 9, pag. 1444–1458, 2018.
- TORRICO, C. E. R., GAMARRA, L.A.R., TELES, O.B. Eficacia de la Ozonoterapia en el Control de Mastitis Bovina. **Research Gate**, 2018.
- TUCKER, C.B.; JENSEN, M.B.; DE PASSILLÉ, A.M.; HÄNNINEN, L.; RUSHEN, J.; Invited review: Lying time and the welfare of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 1, nov, 2020.
- VON BORELL, E., LANGBEIN, J., DESPRES, G., HANSEN, S., LETERRIER, C., MARCHANT, J., MARCHANT-FORDE, R., MINEIRO, M., MOHR, E., PRUNIER, A., VALANCE, D., VEISSIER, I. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals - A review. *Physiology and Behavior* Elsevier Inc., , 22 out, 2007.
- WEBSTER, J. Animal welfare: Freedoms, dominions and “a life worth living”. **Animals**, v. 6, n. 6, p. 35, 2016.
- WEBB, L. A., SADRI, H., VON SOOSTEN, D., DÄNICKE, S., EGERT, S., STEHLE, P., SAUERWEIN, H. Changes in tissue abundance and activity of enzymes related to branched-chain amino acid catabolism in dairy cows during early lactation. *Journal of Dairy Science*, v. 102, n. 4, p. 3556–3568, abr, 2019.
- XIAO, W., TANG, H., WU, M., LIAO, Y., LI, K., LI, L., XU, X. Ozone oil promotes wound healing by increasing the migration of fibroblasts via PI3K/Akt/Mtor signaling pathway. **Biosci. Res.** v.37,pag. 1–11,2017.

ZENG, J.; LU, J. Mechanisms of action involved in ozone-therapy in skin diseases. **International immunopharmacology**, v. 56, p. 235-241, 2018.

7. ANEXOS

Artigo 1: Variabilidade da frequência cardíaca para a avaliação do estresse e dor em bovinos da raça holandesa submetidos a diferentes formas de aplicação de ozônio.

Normas da revista Theriogenology (Elevier):

Article structure

Subdivision - numbered sections:

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2.), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. Since an abstract is often presented separately from the article, it must be able to stand alone. For this reason, references should generally be avoided, but if essential, they must be cited in full, without reference to the reference list. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if their use is essential, they must be defined at their first mention in the abstract itself. Abstracts must be limited to a single paragraph with no more than 2,500 keystrokes (characters plus spaces).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references; therefore, do not include them on the title page, as a footnote to the title, etc.. List individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.), sources of financial support, and donations of products and materials.

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, it is recommended to include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult [IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents](#) for further information.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following

policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Preprint references

Where a preprint has subsequently become available as a peer-reviewed publication, the formal publication should be used as the reference. If there are preprints that are central to your work or that cover crucial developments in the topic, but are not yet formally published, these may be referenced. Preprints should be clearly marked as such, for example by including the word preprint, or the name of the preprint server, as part of the reference. The preprint DOI should also be provided.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. Cancer statistics reports for the UK, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, Mendeley Data, v1; 2015.

<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Link de acesso ao site da revista:

<https://www.sciencedirect.com/journal/theriogenology/publish/guide-for-authors>

Artigo 2: Análise da dor e estresse por meio de escala de dor, teores de cortisol e sensores comportamentais em bovinos da raça holandesa submetidos a diferentes formas de aplicação de ozônio.

Normas da revista Animal (Elsevier):

Abstract (max 400 words, single paragraph)

- The context and the rationale of the study are presented succinctly to support the objectives. Experimental methods and main results are summarised but should not be overburdened by numerical values or probability values. The abstract ends with a short and clear conclusion.
- Citations and references to tables and figures are not acceptable.
- Abbreviations should be used sparingly and must be defined in the abstract.
- The whole abstract is written as a single paragraph.

Keywords (5 keywords)

- Five keywords (no more, no less).
- Keywords should be different from words in the title.
- Keywords should be short and specific.
- The animal species or type can be among the keywords but differently from the title.
- The use of non-standard abbreviations in the list of keywords is not allowed. Follow the link to find the standard abbreviations.

Implications (max 100 words)

- The Implications section should answer the questions ‘What did you learn?’, ‘Who may benefit from your results and how?’
- The Implications section should stand alone, be clear to non-specialists while being precise enough for specialists.
- After a brief description of the context and the scientific question, highlight your main findings, and describe the potential applications of your own results and their field of application for the livestock industry. Focus on your take home message.
- Be careful not to oversell your results.
- Write in simple English suitable for non-specialists or even non-science readers.
- Do not use any non-standard abbreviations.

Highlights

- Highlights are a collection of 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point) that convey the core messages of your article.
- When you prepare your Highlights upon request by the Editorial Office, we recommend that the bullet points include 1) a presentation of the research question, 2) your main results, and 3) the potential applications of your own results and their field of application for the livestock industry.
- Do not use any non-standard abbreviations.
- Highlights will be submitted in a separate file in the online submission system as instructed by Editorial Office.

Introduction

- The context is only briefly described. The scientific question is developed and supported by the critical analysis of published work.
- For hypothesis-driven research (Sections 1 to 3), the hypothesis under test should be clearly stated.
- Scarcity of studies is not sufficient to justify research. Increasing the knowledge on a subject is not an objective per se.
- If the implementation of the research results in practice could contravene health, animal wellbeing and environmental standards in countries other than where the work was undertaken, then authors should consider how this will impact on the international relevance of the research.
- If the manuscript is companion to another submission, the introduction presents the links between manuscripts.
- If preliminary results have been published in an abstract form, it is indicated at the end of the introduction.

Material and methods

- Reporting. Material and methods are reported according to "The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research" detailed in Kilkenney et al. (2010)¹ and summarised at www.nc3rs.org.uk.
- Experimental design. When relevant, the experimental design should be presented in a separate sub-section at the beginning of the "Material and methods" section. It explains and justifies the structure of the experimental units (e.g. individual animal, group/pen of animals) and how the controlled experimental factors were organised in treatments to test the hypothesis or answer the specific questions under study. The known and expected sources of variability in experimental units are identified to address replication, blocking or randomization. A power analysis of the experimental design is recommended. Distinction between quantitative and qualitative factors, use of control treatments are presented.
- Description of critical methods. For the sake of reproducibility, the methods that are most important for the conclusions of the study, including mathematical equations, must be described in detail. They can be presented in the Supplementary Materials as necessary.
- Validation and Quality Assurance. Validation is defined as a comparison of the research predictions with the real world to determine whether the results of the research are suitable for their intended purpose. Validation highlights the strengths and the limits of the results obtained, and their applicability. A wide range of validation techniques can be applied, including: comparison with reference measurements (e.g. recovery rates for markers or gaz

exchange measurements), robustness of measurements (e.g. intra- and inter-observer reliabilities for observational measurements), statistical tests (e.g. regression analysis of observed vs. predicted data), deviance measures (e.g. Mean Absolute Error, Root Mean Squared Error), visual techniques (e.g. plot of observed vs. predicted data), subjective assessment (e.g. evaluation by experts). For laboratory methods, results of Quality Assurance tests or method validation procedures refer to performance of assays (e.g. intra/inter-assay CV, reportable range, specificity, normalisation...). Validation and/or Assurance quality procedure and output, must be reported for the methods that are most important for the conclusions of the study in the Material and methods or as Supplementary materials. Alternatively they must be addressed in the Discussion section.

- Statistical analysis of results. The statistical analysis of results should be presented in a separate sub-section at the end of the "Material and methods" section. The software used and the models of statistical analysis must be described, as well as each of the statistical methods used. Sufficient statistical details must be given to allow replication of the statistical analysis. Generally, and when there are more than 2 treatments, an analysis of variance with F-tests is preferred to multiple t-tests. A statistical guide for authors is available on the website at <https://animal-journal.eu/animal-journal/instructions-and-policies/>. The publication of Lang and Altman (2013)² can also be used as a reference. We also recommend you include the code for the statistical model, as programmed in the relevant software, in the Supplementary materials.
- Proprietary product. If a proprietary product is used as a source of material in experimental comparisons, it should be described using the appropriate chemical name. If the trade name is helpful to the readers, provide it in parentheses after the first mention.

Results – Discussion

- Presentation of Results and Discussion in a single section is possible but discouraged.
- If the implementation of the research results in practice could contravene health, animal wellbeing and environmental standards in countries other than where the work was undertaken, then authors should consider how this will impact on the international relevance of the research.
- A short conclusion appears at the end of the text and is merged in a single paragraph.

References

- References from non-peer-reviewed articles or from national abstracts/conference proceedings, MSc or PhD thesis, institutional/technical reports, documents that cannot be obtained easily by the reader should be minimized.
- If a submitted manuscript has previously been published in a limited form (e.g. abstract or short communication to a symposium or part of MSc or PhD theses), the previous publication form should be cited and the full reference should be provided.
- In general, no more than 3 references can be given for the same statement (except for reviews and meta-analyses).
- The list of references used in a meta-analysis should be presented in Supplementary materials.

Link de acesso ao site da revista:

<https://www.sciencedirect.com/journal/animal/publish/guide-for-authors>

https://animal-journal.eu/animal-journal-documents/Instructions_for_authors.pdf