



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in
MEDICINA VETERINARIA

**Effetti fisiologici della Moxibustione nei Pony:
valutazione termografica ed etologica**

Relatore

Prof. Gabai Gianfranco

Correlatore

Dott. Mongillo Paolo

Laureanda

Luisa Piovesana

Matricola n. 1153909

ANNO ACCADEMICO 2023-2024

Abstract

Il presente studio si propone di indagare gli effetti fisiologici sulla specie Equina conseguenti a una pratica di Medicina Tradizionale Cinese nota come Moxibustione indiretta che utilizza il calore di un sigaro medicato chiamato Moxa per stimolare punti precisi e modulare così risposte autonome a scopo terapeutico. Vengono qui indagati 4 Pony sani, su ciascuno dei quali sono stati applicati due stimoli in ordine casuale: un trattamento di Moxibustione indiretta all'agopunto *Zao Bai Hui* secondo le modalità definite da un Veterinario Agopuntore e l'effettuazione degli stessi movimenti previsti dal trattamento sul medesimo punto utilizzando come Controllo un sigaro di tabacco spento al posto di un sigaro di Moxa acceso. In questo modo ogni soggetto può considerarsi controllo di se stesso per le variabili "calore" ed "effetto farmacologico" considerate congiuntamente. L'osservazione sperimentale iniziava 5 minuti prima dell'applicazione di uno dei due stimoli, lo stimolo casuale veniva in seguito applicato per 10 minuti e al termine dell'applicazione seguivano ulteriori 20 minuti di osservazione. I dati raccolti e analizzati sono: la frequenza cardiaca, misurata per mezzo di fonendoscopio all'inizio e alla fine di ogni fase di osservazione, la rilevazione di termogrammi e l'effettuazione di riprese video per indagare l'etogramma manifestato. I risultati del presente lavoro vengono in seguito analizzati e discussi tanto sotto il profilo termografico quanto sotto l'aspetto etologico.

1. Introduzione

1.1 La moxibustione

1.1.1 Premessa

La moxibustione è una pratica terapeutica tradizionale della Medicina Tradizionale Cinese (MTC), che prevede l'applicazione di calore su specifici punti del corpo tramite l'uso di *Artemisia vulgaris* (*moxa*). La moxibustione può essere utilizzata da sola o in combinazione con l'agopuntura, che è un altro pilastro della MTC e insieme a questa viene insegnata in appositi corsi di specializzazione (Gaidano & Pozzi, 2020). Sebbene entrambe le tecniche siano basate sugli stessi principi metodologici, come meridiani ed agopunti la moxibustione si distingue per l'applicazione termica, mentre l'agopuntura utilizza aghi di diversi spessori per stimolare i punti specifici.



Artemisia vulgaris

Immagine 1.1.1
Pianta di Artemisia vulgaris tratta da
https://it.wikipedia.org/wiki/Artemisia_vulgaris

1.1.2 Meccanismi di Funzionamento

Il principale meccanismo di azione della moxibustione è il calore, che viene applicato sui punti di agopuntura per stimolare la circolazione sanguigna, rilassare i muscoli e promuovere, nell'ottica della MTC, l'equilibrio energetico.

Sempre secondo la MTC, il calore della moxa aiuta a tonificare il Qi e a riscaldare l'energia interna, soprattutto in caso di carenza o stagnazione di Qi e sangue. Inquadrate in un contesto di medicina Occidentale, questa pratica sembra suggerire dunque l'induzione di cambiamenti a livello autonomico. Inoltre, la moxibustione è associata a miglioramenti della funzione immunitaria, della regolazione ormonale e nella modulazione della risposta infiammatoria (Huang & Sheu, 2011; Montanholi et al., 2008). Questi effetti possono essere spiegati anche in termini fisiologici, poiché il calore stimola la produzione di endorfine, aumenta la vasodilatazione e favorisce una risposta antinfiammatoria locale (Cook, 2001; Travain & Valsecchi, 2021).

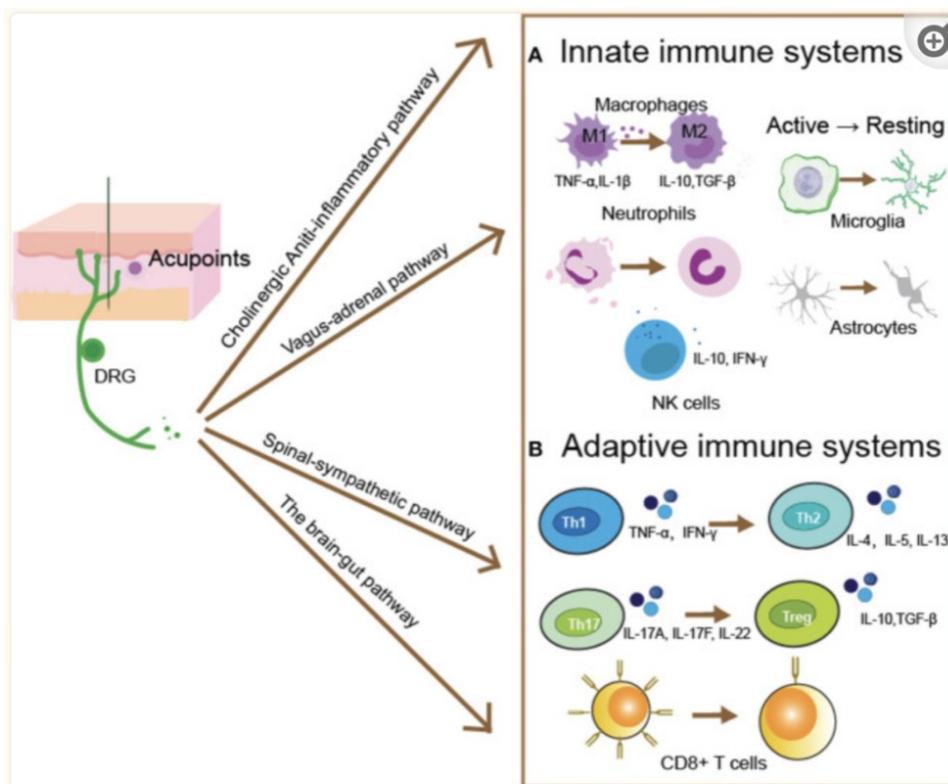


Immagine 1.1.2

Effetti della moxibustione sul sistema immunitario

Immagine tratta da www.paoloevangelista.it/i-mechanismi-immunomodulatori-dellagopuntura/

1.1.3 Tipi di Moxibustione

Esistono diversi tipi di moxibustione, che si differenziano per la modalità di applicazione del calore. I principali tipi di moxibustione sono illustrati nella seguente tabella:

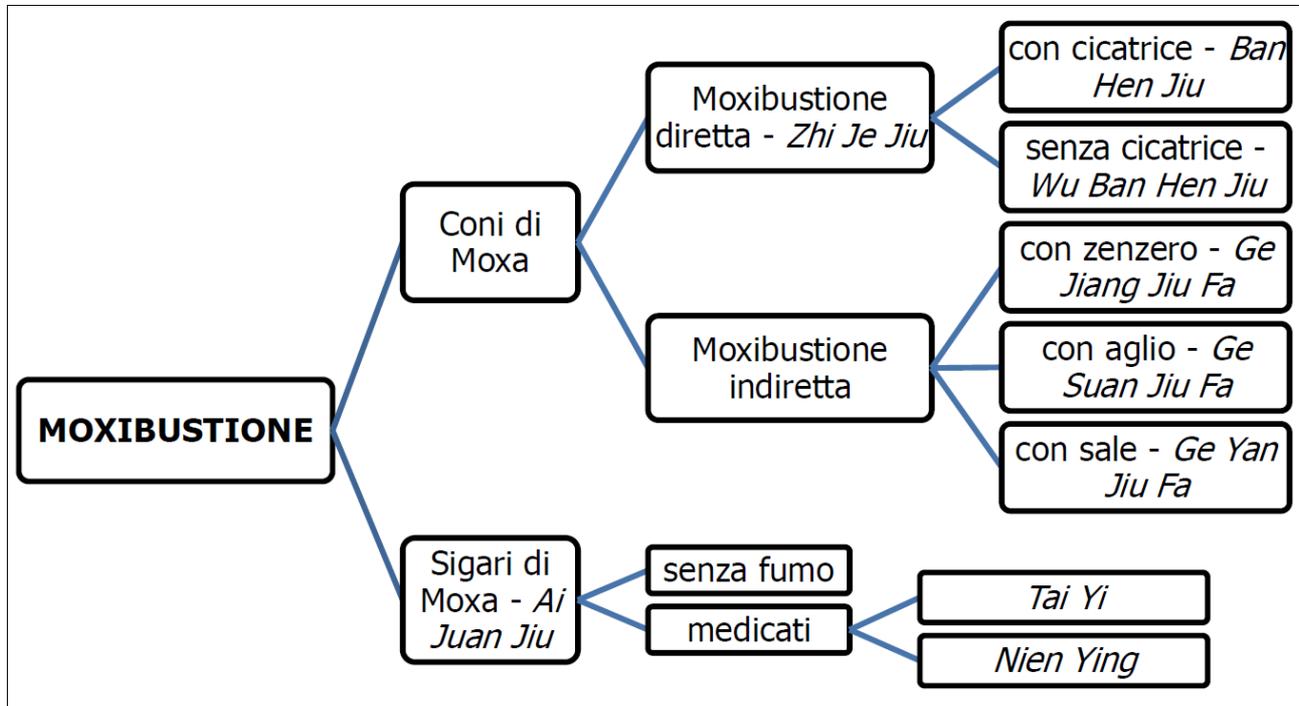


Immagine 1.1.3 Diversi tipi di moxibustione Immagine tratta da Gaidano, B., & Pozzi, R. (2020). *IMPIEGO CLINICO DELLA MOXA NEL GATTO Clinical Use of Moxa in Cats*

In medicina veterinaria si effettua quasi unicamente la Moxibustione con sigaro di moxa.

1.1.4 Rilevanza degli agopunti nella Moxibustione

Gli agopunti sono punti specifici del corpo che, secondo la MTC, corrispondono ai meridiani attraverso i quali scorre l'energia vitale. È stata dimostrata una corrispondenza tra agopunti individuati nella tradizione della MTC e aree anatomiche aventi differenti caratteristiche citologiche rispetto all'intorno, risultanti in una maggiore capacità di conduzione degli stimoli(Schoen, 2001). La stimolazione di questi punti, sia con aghi (agopuntura) che con calore

(moxibustione), ha dimostrato produrre effetti differenti rispetto alle stesse pratiche eseguite su punti casuali o “finti agopunti” sia in Medicina Umana che in Medicina Veterinaria (Dai et al., 2023; Huang & Sheu, 2011; Muniem & Aljobory, 2017; Von Schweinitz, 1998)

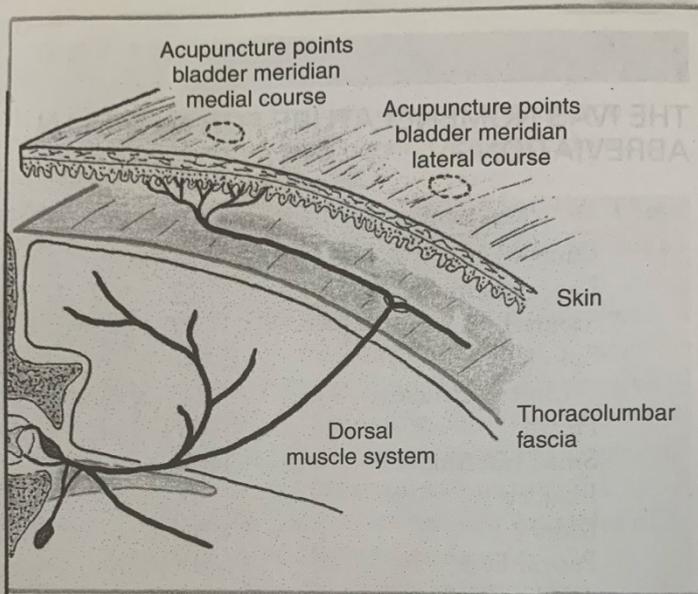


Fig. 2-6 Cutaneous nerve entering the dermis at an acupuncture point along the Bladder meridian.

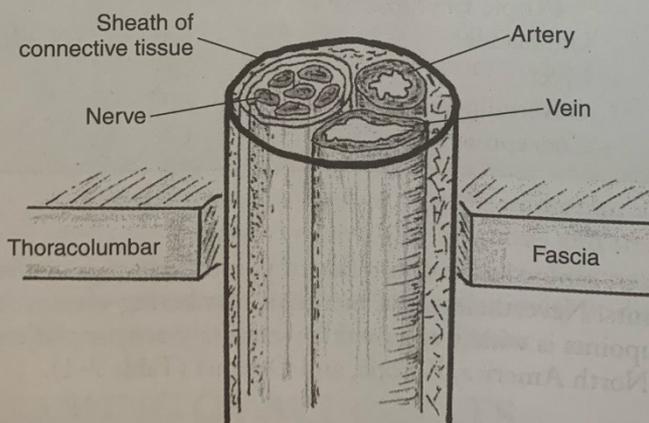


Fig. 2-7 Histologic structure of bundles perforating the fascia at acupuncture points. This is a diagrammatic representation of the histologic structure in Fig. 2-5.

Immagine 1.1.4 Citologia di un agopunto, tratta da Schoen, A. M. (2001). *Veterinary Acupuncture. Ancient Art to Modern Medicine*, Mosby.

1.2 Il Cavallo come soggetto/paziente

1.2.1 La Termografia come indicatore di Benessere negli Equini

Nella specie Equina le motivazioni a condurre indagini termografiche relativamente al Benessere animale differiscono da quelle considerate per altre specie (McCafferty et al., n.d.; Phillips & Heath, 1995, 2001), come la specie Bovina (Church et al., 2014; Lees et al., 2020; Montanholi et al., 2008; Stewart et al., 2007; St-Pierre et al., 2003), divenuta oggetto di consistenti studi per le sue differenti attitudini produttive, o le specie da laboratorio, il cui focus mira a garantire il rispetto di prescrizioni legislative e principi etici, ma anche all'elaborazione di standard di riferimento sull'assenza di stress e dolore potenzialmente applicabili ad altre specie. Se la maggior parte degli studi sul Benessere animale-frutto della crescente attenzione alla creazione di sistemi di allevamento eticamente accettabili-è genericamente orientata alla salute come assenza di malattia, alla sicurezza alimentare e alla qualità delle produzioni (Stewart et al., 2005), si può affermare che gli ambiti di esclusivo interesse al benessere Equino siano ispirati dalla necessità di garantire salute all'animale da competizione per massimizzare le performance e ridurre al minimo lo stress, anche al fine di scongiurare il ricorso a terapie farmacologiche a ridosso di gare ed eventi sportivi. Ma gli stessi standard relativi all'assenza di dolore e stress devono necessariamente applicarsi anche agli Equini impiegati in attività didattiche o ludiche di stampo non competitivo, in cui oltretutto spesso gli animali sono a contatto con soggetti fragili: si pensi ad esempio agli Interventi Assistiti con gli Animali, all'Ippoterapia, o all'equitazione in training praticata da persone inesperte, tra i quali anche i bambini. In entrambi gli scenari, al di là di una componente individuale relativa al temperamento (Lees et al., 2020), sono l'assenza di dolore e la minimizzazione dello stress ad

assicurare piena sicurezza e collaborazione nello svolgimento delle attività in cui gli Equini sono coinvolti.

1.2.2 Ipertermia e lesioni tissutali

La rilevazione termografica della presenza di dolore si fonda sulla circostanza che uno stimolo nocicettivo, se causato da un evento traumatico (Zachary & McGavin, 2010) o da dolore neuropatico (Bufalari & Lachin, 2012), attiva la cascata citochinica che ha come risultato una variazione termica in aumento nella regione corporea lesa e la percezione del dolore. Del resto, in presenza di danno tissutale si avvia il processo di infiammazione, che annovera tra le sue cinque caratteristiche fondamentali il calore sull'area sede di lesione. Per questo motivo la termografia viene riconosciuta come mezzo di indagine accurato e affidabile per la rilevazione di fenomeni algici nella pratica clinica equina (Soroko & Howell, 2018), nonché per il monitoraggio della progressione dei processi patologici riscontrati sull'animale e dell'efficacia delle terapie attuate per farvi fronte (Von Schweinitz, 1998).

1.2.3 Fisiologia dello stress

La valutazione relativa alla presenza o assenza di stress appare più complessa da indagare sugli animali. Dal punto di vista fisiologico, la risposta di un organismo a uno stimolo potenzialmente pericoloso è l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). Infatti, a fronte di un accadimento o di un evento improvviso indicativo di minaccia -anche soggettivamente percepita ma non oggettivamente reale- o fonte di disagio per un individuo, viene innescata una serie di risposte da parte del Sistema Nervoso Autonomo (SNA) atto ad assicurare all'organismo un accomodamento in termini omeostatici compatibile con la situazione in atto. Si rileva nello specifico una risposta in due fasi (Sjaastad et al., 2013): la prima mediata dalla componente Simpatica del

SNA, che prepara in un brevissimo lasso di tempo a uno scenario di “lotta o fuga”, votato alla sopravvivenza dell’individuo nell’immediato; la seconda, di pertinenza della componente Parasimpatica del SNA, oltre a guidare i processi fisiologici dell’organismo verso gli equilibri che aveva prima dell’esposizione allo stimolo, è responsabile dell’accomodamento alla presenza e potenzialmente alla persistenza dello stimolo inizialmente percepito come pericoloso, mediando quindi la necessità dell’organismo di conservarsi in condizioni sub-ottimali e in un orizzonte temporale di più ampio respiro. Lo stimolo si trasforma quindi da minaccia a fonte di stress a durata indeterminata. Nessuna delle due branche del SNA (Simpatica e Parasimpatica) viene completamente silenziata e in ogni dato momento è la combinazione dei meccanismi messi in atto da entrambe le componenti -e quindi la relativa prevalenza dell’uno o dell’altro sistema- a determinare l’omeostasi complessiva. Il fatto che entrambe le componenti abbiano un tono basale durante la fase di riposo determina l’influenza del sistema Simpatico anche in assenza di stimolo stressogeno (Sjaastad et al., 2013): al ridursi della frequenza di stimolazione delle fibre simpatiche al di sotto di un tono considerato consueto per quell’organismo, l’effetto sarà di rilasciamento della muscolatura liscia, anche dei vasi sanguigni, con aumento del diametro degli stessi e conseguenti effetti tanto sulla frequenza cardiaca quanto sulle variazioni termiche del soggetto. Del resto, taluni Autori (Kreibig, 2010) rilevano come non si possa tracciare una netta demarcazione tra le due branche del SNA, riscontrando attività della componente Parasimpatica sia in presenza di uno stimolo piacevole per l’animale che in reazione a uno stimolo spiacevole. Come risultato dell’attivazione dell’asse HPA, le ghiandole surrenali producono una serie di ormoni regolatori essenziali per numerose funzioni dell’organismo; tra questi ormoni vi è il Cortisolo, un glucocorticoide che attraverso meccanismi differenti prepara l’organismo a fronteggiare situazioni di pericolo aumentando

la glicemia, inibendo la crescita -e dunque il fabbisogno di nutrienti- e rendendo possibile la vasocostrizione necessaria a prevenire situazioni di ipotensione, con conseguente variazione della temperatura corporea del soggetto. Il Cortisolo è detto l'ormone dello stress in virtù dei cambiamenti metabolici che induce; non a caso, si riscontra un notevole aumento della sua concentrazione in situazioni considerate stressanti per il soggetto.

1.2.4 Misurare lo stress: un approccio multimodale

Le attuali conoscenze e i moderni sistemi diagnostici consentono di indagare l'attivazione di una risposta stressogena con modalità diverse dalla concentrazione di cortisolo ematica o salivare, come la variazione della frequenza cardiaca (Stucke et al., 2015) o la manifestazione di comportamenti specie-specifici (Minero et al., 2015) e il dibattito scientifico sul metodo di osservazione più accurato e affidabile per ogni specie animale è fervente. A questa gamma di possibilità, recentemente si è aggiunta l'indagine termografica (Janczarek et al., 2016), che fomenta la discussione soprattutto nel confronto con altre misurazioni correlate all'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA). A fronte di una disponibilità di dati numericamente più limitata nel Cavallo, si rileva curiosamente che il primo studio volto a verificare una correlazione tra termografia a infrarossi e attività dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene fu svolto proprio sulla specie Equina (Cook, 2001).

1.2.5 Stress e variazioni termiche negli Equini

Ecco che allora trovare, nella topografia specie-specifica, zone che si dimostrino fortemente correlate -in positivo o in negativo- all'attivazione di risposte allo stress diventa importante. Come già dimostrato per altre specie (Arfuso et al., 2022; Foster & Ijichi, 2017a, 2017b; Ijichi et al., 2020), la temperatura dell'occhio si è rivelata particolarmente indicativa di stimolazione

nervosa autonoma nel Cavallo (EstevesTrindade et al., 2019; Jansson et al., 2021; Kim & Cho, 2021) e nel Pony (Johnson et al., 2011). Numerose pubblicazioni sui Cavalli correlano positivamente la termografia oculare all'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA)(Cook, 2001; Valera et al., 2012), attestata sia attraverso le variazioni nella concentrazione di cortisolo ematico che salivare, con correlazione più forte a livello salivare(Valera et al., 2012). In particolare, il canto mediale della rima oculare si è dimostrato essere la regione più correlata alle variazioni della temperatura rettale(Kim & Cho, 2021); nello stesso studio gli Autori riescono a dimostrare matematicamente che l'accuratezza delle rilevazioni termografiche è negativamente correlata al numero di pixel considerati per calcolare la media della temperatura, e individuano come regione più indicativa di attività del SNA l'area delle dimensioni di 2X2 pixel che rilevi la temperatura massima nella regione del canto mediale. Tale regione, in altri studi(Stewart et al., 2007), coincide con la caruncola lacrimale, che si pensa essere più sensibile alle variazioni di temperatura in quanto fittamente vascolarizzata.

La continua ricerca di parametri attestanti l'assenza di dolore e di stress nel Cavallo ha peraltro portato alla conduzione di osservazioni termografiche in cui è proprio l'attività specifica svolta da una categoria - il dressage(Sánchez et al., 2016), la corsa (Soroko et al., 2016) o il salto ad ostacoli(Valera et al., 2012)-ad essere indagata quale stimolo potenzialmente stressogeno. E i risultati hanno rivelato che i soggetti più performanti sembrano presentare non tanto un minore livello di stress fisiologico, quanto una maggiore capacità di adattamento allo stesso, vale a dire: individui con livelli di cortisolo non dissimili dai competitors a ridosso dell'evento osservato ma con intensità e tempi di recupero inferiori in termini di variazioni termiche. A fronte di un aumento della temperatura oculare correlato alla concentrazione di cortisolo (attestante, secondo gli Autori, che la

variazione termica del soggetto sia mediata almeno in parte dall'asse HPA) il ritorno a valori basali di cortisolo e temperatura avviene peraltro con **due ritmi e due trend differenti**. Questo attribuirebbe alla termografia il merito di discriminare in certa misura e in tempi più rapidi le diverse fasi di risposta dell'organismo a uno stimolo stressogeno: una variazione di parametri immediata per il mantenimento dell'omeostasi in presenza dello stimolo e un accomodamento a queste variazioni successivo all'esposizione, che può essere variamente modulato da soggetto a soggetto.

Ciò non dovrebbe stupire, considerando che alcuni centri di integrazione delle fibre autonome si trovano nell'ipotalamo, cioè in connessione con il sistema limbico e altri nel midollo allungato, vale a dire a contatto con la corteccia cerebrale: in altre parole, le funzioni autonome sono collegate al sistema emozionale dell'animale e possono godere di percezione cosciente. E' ormai considerato scientificamente fondato che "Emozioni, pensieri e risposte autonome non sono tra loro indipendenti"(Sjaastad et al., 2013) ma si interfacciano con reciproci rimandi al bagaglio di precedenti esperienze del soggetto, attraverso proiezioni di impulsi nervosi e attivazione di sistemi a feedback. In letteratura(Rodrigues et al., 2022; Sánchez et al., 2016; Soroko et al., 2016; Stewart et al., 2005; Travain & Valsecchi, 2021) sono riconosciuti tre tipi di stress attribuibili agli Equini: stress fisiologico, frutto di una risposta endocrina, stress psicologico(Jensen & Toates, 1997), in cui la rievocazione di esperienze passate induce nel soggetto uno stress di tipo cosciente verso stimoli ritenuti simili a quelli da esso precedentemente sperimentati e memorizzati come negativi e stress emotivo, o distress (Daglish et al., 2017), in cui la rielaborazione cognitiva di tali esperienze non è in grado di produrre una risposta comportamentale coerente con l'accomodamento allo stimolo, per cui sembra venire mediata unicamente dal sistema limbico. Appare evidente che

un'interpretazione settoriale dello stress non sia in grado di anticipare né di quantificare le risposte autonome osservabili sul soggetto, ma al contrario la complessità delle interazioni tra sistemi diversi renda opportuna l'adozione di più modalità di indagine per poter valutare compiutamente lo stress come stato fisiologico del soggetto.

1.2.6 I vantaggi della termografia nella valutazione del Benessere Animale

Andando ad analizzare i differenti parametri con i quali è ad oggi possibile rilevare l'attivazione dell'asse HPA emerge che la concentrazione di cortisolo pone dei problemi di natura gestionale oltre che interpretativi: un'errata frequenza di campionamento rischia infatti di non evidenziare le risposte autonome rapide insorte nell'organismo, senza contare che la concentrazione degli ormoni precursori del cortisolo segue un andamento circadiano, rendendo le misurazioni potenzialmente dipendenti dall'orario del giorno in cui vengono effettuate. Quanto poi alla frequenza cardiaca, essendo soggetta alla regolazione da parte di centri di integrazione differenti, rende di fatto impossibile l'attribuzione di una sua variazione all'attività metabolica piuttosto che a una risposta di tipo emozionale. Al contrario, il rapido accomodamento della temperatura oculare farebbe della termografia un mezzo apparentemente in grado di discriminare le due fasi di risposta a uno stimolo stressogeno, consentendo di scindere la componente psicologica dello stress nel complesso fenomeno di attivazione dell'asse HPA (Stewart et al., 2005).

A ben vedere, avendo dimostrato una correlazione tra variazioni termografiche e attività del SNA, la termografia potrebbe diventare uno strumento prezioso negli studi sul Benessere animale, presentando notevoli e determinanti vantaggi rispetto ad altri sistemi di osservazione: l'accuratezza delle misurazioni e la loro

correlazione in termini quantitativi e temporali, la relativa facilità d'uso, l'assenza di contatto diretto sull'animale e quindi il venir meno della necessità di rigidi sistemi di contenimento (con conseguente eliminazione di tutti i possibili *bias* da essi derivanti), l'ottenimento di risultati in tempo reale e la possibilità di osservazioni continuative, con conseguente migliore precisione nella misurazione di cambiamenti a lento accomodamento post-stimolazione (Travain & Valsecchi, 2021).

1.2.7 IRT e Agopuntura: connubio innovativo o antiche conferme?

Alla luce di queste considerazioni, l'utilizzo della termografia per indagare gli effetti dell'Agopuntura appare in diversi studi in cui il Cavallo è la specie osservata, al punto da venire suggerita come strumento utile anche nel follow-up dei trattamenti di Agopuntura, per valutare quantitativamente il beneficio apportato o per stabilire l'adeguatezza dell'agopunto (Soroko & Howell, 2018). L'effetto del trattamento sulla temperatura corporea può essere in aumento o in diminuzione a seconda dell'agopunto selezionato, delle caratteristiche individuali del paziente e della tecnica di inserimento dell'ago (Munier & Aljobory, 2017). In un altro esperimento (Dai et al., 2023) la termografia è stata utilizzata per validare la corrispondenza tra agopunti e regioni del corpo a questi non contigue: in seguito a un confronto tra aree dello zoccolo potenzialmente patologiche, individuate con una tecnica diagnostica di Agopuntura applicata a specifici punti distanti dagli arti, e scansione termografica, è emerso che le zone riconosciute come alterate dall'Agopuntura si presentassero ipertermiche e dissimili dalle analoghe zone controlaterali, ancor prima che il Cavallo manifestasse sintomi algici o anomalie posturali. L'Agopuntura ha peraltro dimostrato di apportare benefici a Cavalli con patologie neuromuscolari cervicali e lombari (Von Schweinitz, 1998); l'analisi termografica ha consentito altresì di affermare che l'Agopuntura sia in grado di

correggere le anomalie vasomotorie riscontrate in corso di talune patologie neuromuscolari, circostanza spiegabile solo ipotizzando che la stimolazione di precisi agopunti determini una modulazione dell'attività autonoma. Gli Autori imputano al trattamento di Agopuntura un aggiustamento del tono del sistema Simpatico, responsabile del ripristino dell'omeostasi circolatoria. In un altro studio (Rodrigues et al., 2022) su soggetti sani, si sono valutati gli effetti termici e le manifestazioni etologiche di soggetti sottoposti ad esercizi di attivazione muscolare, ad un trattamento di Agopuntura, o ad entrambe le manipolazioni. In questo caso, la termografia ha consentito di apprezzare un aumento di temperatura corporea solamente nei Cavalli non sottoposti al trattamento di Agopuntura, ma unicamente alla sessione di esercizi funzionali. I soggetti che avevano ricevuto entrambi gli stimoli non presentavano variazioni termiche rilevanti, circostanza che induce a presumere che l'Agopuntura abbia influito sulla funzione vasomotoria, al punto da annullare gli effetti termici derivanti dall'attività di attivazione muscolare. Un'altra possibile spiegazione avanzata dai conduttori dello studio è che la seduta di Agopuntura, attraverso il miglioramento della circolazione, **abbia favorito il rapido adattamento dell'organismo a una situazione potenzialmente stressante**, come sembrerebbe emergere dalla congiunta analisi etologica effettuata: tutti gli animali sottoposti ad Agopuntura -come unico trattamento o in combinazione con la mobilitazione fisica- aumentavano l'espressione di comportamenti considerati indicativi di rilassamento negli Equini.

1.2.8 La duplice valenza del calore in Moxibustione: peculiarità osservazionali

Quanto sopra esposto relativamente all'Agopuntura si estende alla pratica della Moxibustione: in uno studio termografico sulle diverse tipologie di Moxibustione su uno stesso agopunto (Huang & Sheu, 2011) è emerso come sia la profondità

dello stimolo applicato a determinare effetti benefici differenziali, e non la natura meccanica o termica dello stimolo. Ma gli Autori si spingono anche oltre: trovando corrispondenza tra profondità dello stimolo ed effetto clinico indicato nei Manuali storici di Agopuntura e Moxibustione, ritengono verosimile l'indicazione terapeutica della Moxibustione -da sola o associata all'Agopuntura tradizionalmente intesa- in taluni quadri clinici nei quali il mero inserimento degli aghi non viene ritenuto sufficiente a sortire un effetto terapeutico apprezzabile, attribuendo allo stimolo indotto dalla Moxibustione una maggiore capacità di penetrazione rispetto a quello ottenibile dall'Agopuntura.

La natura singolare dell'osservazione con mezzi termografici della Moxibustione è che essa utilizza la veicolazione del **calore come mezzo terapeutico**. La variazione termica in un distretto corporeo, che normalmente è un indicatore di danno tissutale, viene indotta di proposito allo scopo di conseguire un effetto benefico, con conseguenti osservazioni termografiche che potrebbero discostarsi dalla consueta associazione dell'ipertermia a un processo patologico in atto. Inoltre, l'attivazione dell'asse HPA, comprovata durante la stimolazione degli agopunti, sembra avere implicazioni positive, facilitando l'accomodamento dell'organismo a una condizione definita di *eustress*. Dunque non sarebbe soltanto uno stimolo negativo ad avviare tale risposta autonoma (Travain & Valsecchi, 2021) ma anche uno stimolo terapeutico capace di indurre risposte analoghe.

1.2.9 Lo stimolo positivo

Se è vero che da un punto di vista etologico negli Equini sono stati descritti comportamenti riconosciuti dalla comunità scientifica come indicativi di rilassamento (Draaisma, 2017), si pone il problema di ricondurre le osservazioni

termografiche a uno stato di benessere psicologico, fattore considerato fondamentale tra i ricercatori gli esperti di specie Equine, qualitativamente diverso dalla mera assenza di malattia o dallo stato fisiologico di riposo. Ulteriore criticità in tal senso è la necessità di interpretare la sequenza delle immagini termografiche a fronte dell'applicazione di uno stimolo considerato positivo.

Ecco allora che per poter affermare che i soggetti osservati non stiano sperimentando una situazione di stress, disagio o dolore, si rende necessaria l'osservazione dei comportamenti di questi animali al momento dell'applicazione dello stimolo, per indagare se la risposta emozionale cosciente rifletta la percezione dello stimolo come stressogeno, neutro o piacevole.

Analizzare il Cavallo sotto questi profili spinge a ulteriori considerazioni che ampliano la complessità delle correlazioni tra Benessere animale, inteso come stato fisico e mentale non neutro, e manifestazioni etologiche, in quanto è scientificamente dimostrato che il Cavallo sia occasionalmente in grado di dissimulare sia il dolore che lo stress (Squibb et al., 2018).

1.3 Etologia rilevante: il Benessere equino oltre l'assenza di stress

1.3.1 Il Cavallo: un soggetto particolare

Anche con riferimento allo studio dell'etologia in relazione allo stress, la specie Equina presenta alcune particolarità di indagine. Infatti, il contesto culturale dell'ambiente equestre e gli scopi per cui gli Equini vengono osservati hanno indotto la comunità scientifica già da alcuni decenni a considerazioni metodologiche e valutative che non si riscontrano nella maggior parte delle altre specie.

Se gli animali da compagnia storicamente più indagati in tal senso sono stati cani e gatti (Gleerup et al., 2018; Normando et al., 2003), e se i motivi per cui si guarda al Benessere Animale degli Erbivori sono legati a contesti di produttività, Cavalli ed Asini nei loro numerosi e differenti impieghi nelle attività umane costituiscono un esempio peculiare di animali coinvolti in dinamiche comportamentali complesse con l'Uomo, ma che in Natura sono prede. La combinazione di queste caratteristiche, ha fatto sì che lo studio dell'etologia equina si sviluppasse in alcune criticità che è bene tenere in considerazione ai fini del presente Studio.

1.3.2 La variabilità individuale

Per prima cosa, storicamente, gli Studi sulla risposta allo stress degli Equini sono stati tra i primi a tenere in considerazione una possibile rilevante differenza individuale (Koolhaas et al., 1997; Wemelsfelder ', 1997) nei comportamenti dimostrati da animali sottoposti a un medesimo stimolo in assenza di differenze rilevanti nelle misurazioni fisiologiche, conclusione che

può essere frutto di una maggiore variabilità nella capacità di risposta e di accomodamento al contesto nelle specie equine rispetto ad altre specie, o di un'attitudine osservazionale più dedicata al soggetto come individuo, in virtù del fatto che la Medicina Equina non sia necessariamente una Medicina "di mandria" e che le attività equestri fondino training e risultati sulle caratteristiche del soggetto. Un'ulteriore spiegazione potrebbe derivare proprio dal diverso grado di training nonché dai metodi con cui il soggetto è stato allenato ed educato nel corso della vita. A prescindere dal peso che questi fattori hanno nel determinare una variabilità etologica individuale, ad oggi la maggior parte degli Studi sulla fisiologia dello stress equino tende a tenere in rilevante considerazione la variabilità individuale nelle osservazioni sperimentali.

1.3.3 I segnali calmanti

Autorevole Letteratura (Draaisma, 2018), inoltre, attribuisce alle caratteristiche intrinseche degli Equini lo sviluppo evolutivo verso l'elaborazione di complessi Segnali Calmanti che sarebbero utili, allo stato brado, per minimizzare l'occorrenza di conflitti e attivare una comunicazione rapida e precisa con il gruppo sociale dei conspecifici. La codificazione di questi segnali, oltre a essere ampiamente supportata in ambito Accademico, complice il fatto che la muscolatura degli Equini consenta loro di esprimere una gamma di espressioni articolata, è stata oggetto di approfondite revisioni e ampliamenti (Dalla Costa et al., 2017; Dyson et al., 2018; Mullard et al., 2017) essendo funzionale all'esigenza di evitare escalation aggressive o comportamenti impulsivi da parte di questi animali e di mettere conseguentemente in sicurezza anche le persone, professionisti e non, coinvolte nelle interazioni con essi.

1.3.4 Gli stati emotivi nella valutazione etologica

Affermare pertanto che gli Equini abbiano una gamma di comportamenti indicativa di differenti stati emotivi, concetto complementare e non antitetico alla teoria dei sistemi motivazionali (Koolhaas et al., 1997), non solo è accettato (anche dalla classe Veterinaria) e scientificamente **supportato da misurazioni fisiologiche** (Hintze et al., 2016), ma trova **consenso** nell'interpretazione qualitativa di molti dei segnali individuati (Pearson et al., 2021).

Tali stati emotivi, che si ricollegano e superano alcuni limiti interpretativi di metodi di rilevazione standard, possono peraltro avere valenza sia negativa, come lo stress, sia positiva, come il rilassamento (Hall et al., 2019). Del resto, l'attribuzione di motivazioni soggettivamente interpretabili e la scelta lessicale su categorie qualitative non è in contrasto con la finalità di trovare una spiegazione oggettiva ai comportamenti manifestati. Taluni Studiosi di Benessere Animale considerano al contrario auspicabile un tentativo da parte della Comunità Scientifica di preservare la variabilità dinamica e la sottigliezza delle categorie individuabili dall'osservatore Umano nel suo ruolo di interprete attivo della realtà, nel tentativo di comprenderla e formalizzarla con metodo scientifico, ponendo al contempo la **validazione scientifica delle osservazioni qualitative** effettuate come condizione essenziale all'utilizzo di un simile approccio in ambito Accademico (Wemelsfelder, 1997).

1.3.5 Etogrammi diversi per necessità diverse

A mano a mano che l'Etologia Equina si sviluppa verso il superamento del concetto meccanicistico, emergono peraltro critiche e spunti (Gleerup et al., 2018) utili a estendere gli etogrammi validati a categorie qualitative diverse: per esempio, applicando a diversi stimoli positivi e negativi la HGS (Horse Grimace Scale) una scala di punteggio validata per stimare il grado di dolore percepito da un Cavallo sulla base delle espressioni facciali che esprime, è emerso che essa

fornisce risultati significativi solamente in presenza di una componente algica e non per esempio in costanza di paura. La specificità di questa scala, dunque, non solo avvalorata il concetto delle espressioni facciali come categorie qualitative valide, ma dimostra che stati emotivi differenti alterano le espressioni facciali dei Cavalli in maniera diversa, a riprova del fatto che l'articolazione di una così complessa gamma di espressioni facciali rivesta un peso maggiore di quanto si supponesse in passato. Queste evidenze impongono una ricerca attiva verso l'elaborazione di scale specifiche per diversi stati emotivi.

1.3.6 La scala positiva

Emerge inoltre, a seguito di una Letteratura scientifica sempre più attenta e precisa, come lo sforzo interpretativo dei professionisti del settore sia più focalizzato e meglio codificato per le espressioni e i comportamenti in risposta a stimoli negativi (Pearson et al., 2021). Di fatto, la gran parte della recente ricerca in etologia equina mira a elaborare chiavi interpretative che affinano le conoscenze precedenti, nel tentativo di ricalcare la specificità e la molteplicità dei contesti in cui possono venire a trovarsi questi animali. In ambito Accademico, si fa sovente riferimento alla all'esiguità e alla necessità di implementazione di modelli interpretativi che codifichino stati emotivi positivi.

Alla luce delle considerazioni esposte, nel presente studio si riportano in traduzione i termini utilizzati nelle pubblicazioni prese come modello di riferimento, avendo cura di adottare quei sistemi di codificazione etologica che hanno dimostrato maggior solidità di correlazione con la misurazione di parametri fisiologici quantitativi.

2. Materiali & Metodi

2.1. Soggetti sperimentati e sede delle rilevazioni

Per l'esperimento di seguito descritto vengono selezionati 4 (QUATTRO) Pony afferenti al maneggio *Animal pensando* situato a Campolongo Maggiore (VE), sede delle rilevazioni previste. Trattasi di 4 Pony, 2 maschi e 2 femmine, con un range di età compreso tra 7 e 21 anni (media 16 anni; deviazione standard 6,22).

Gli animali sono stati scelti su suggerimento della titolare unicamente in base al loro temperamento. Caratteristiche soggettive quali la razza, il sesso, l'età o l'altezza al garrese sono da considerarsi variabili casuali ai fini del presente lavoro. Come illustrato nella tabella sottostante, ad ogni Pony è stato assegnato un numero identificativo (ID) progressivo da 1 a 4, con il quale è univocamente individuato ai fini dell'esperimento.

ID	Nome	Sesso	Età
1	Babù	M	7
2	Biscotto	M	19
3	Diavolina	F	21
4	Nerina	F	17

Tabella 2.1.1 Anagrafica dei soggetti sperimentali



Immagine 2.1.1 Dettaglio della struttura *Animal pensando* di Campolongo Maggiore (VE), sede delle rilevazioni sperimentali

2.2 Stimoli applicati e modalità di applicazione

Ai fini del disegno sperimentale, è individuato sugli Equidi l'agopunto chiamato in Medicina Tradizionale Cinese *Zao Bai hui*. L'individuazione avviene tramite palpazione, essendo riconoscibile al tatto come un leggero avvallamento sul dorso dell'animale nella regione lombo-sacrale, 3-4 cm cranialmente al punto in cui la colonna vertebrale si interseca con una linea ad essa idealmente perpendicolare che unisce le protuberanze delle ali iliache del bacino.

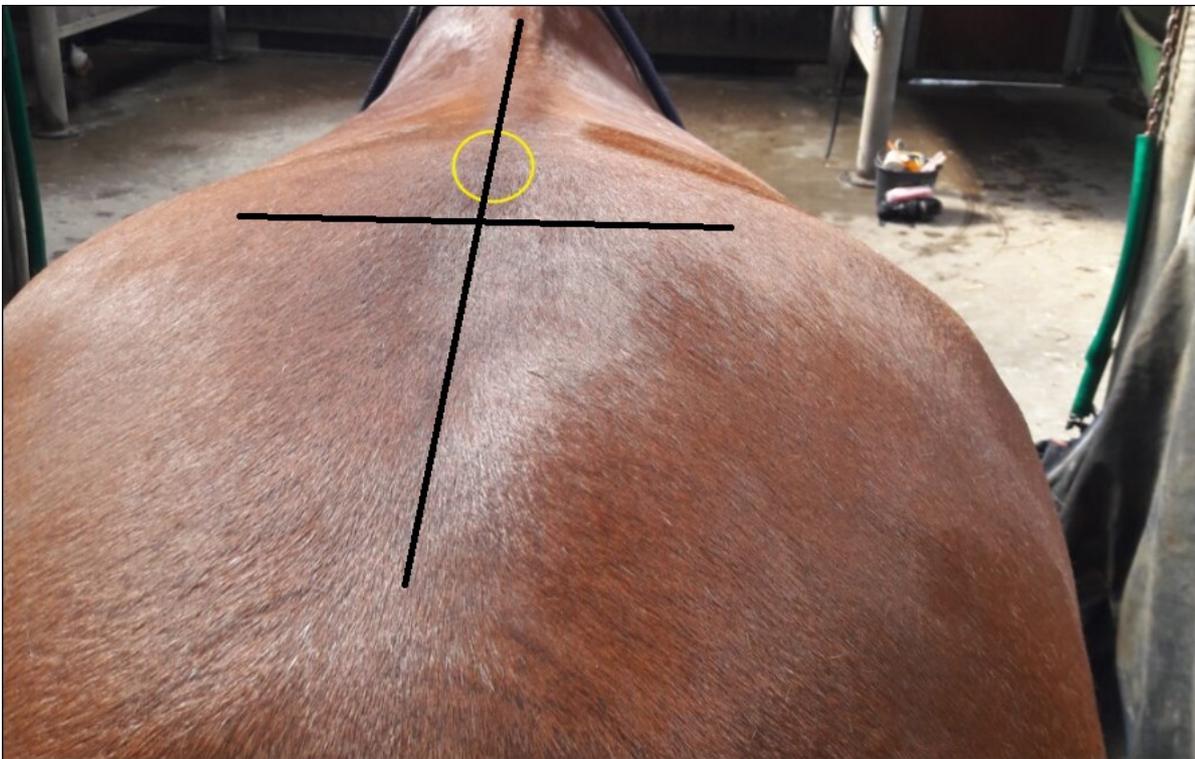


Immagine 2.2.1 Individuazione dell'agopunto *Zao Bai Hui* sul dorso di un Cavallo.
Immagine tratta dal sito <https://www.paardenfeest.com/>

Lo stimolo dato dalla Moxibustione comporta l'utilizzo di un sigaro di Moxa (di seguito nominato semplicemente Moxa), un dispositivo tradizionalmente usato nei trattamenti di moxibustione, che consiste in un cilindro contenente foglie essiccate di *Artemisia vulgaris* rivestito di carta di riso e confezionato con un package cartaceo standard, recante la descrizione del contenuto in lingua Cinese e Inglese.

Per applicare lo stimolo Moxibustione si rimuove una porzione della carta di packaging da una delle due estremità del sigaro e si procede all'accensione della stessa per contatto con una fiamma viva, fino a che non si osserva la combustione luminosa del materiale vegetale riscaldato con fuoriuscita di fumo dalla Moxa, quindi la impugnata come penna e avvicinata al dorso dell'animale, a una distanza di circa 2 cm dalla cute, in corrispondenza del punto precedentemente individuato, in senso orario. La mano dell'operatore utilizzando la Moxa che non sta deve essere appoggiata sul Pony in un'area più craniale alla zona investita dall'esposizione alla Moxa.



Immagine 2.2.3 Esempio di trattamento di Moxibustione sul dorso di un Cavallo. immagine tratta dal sito <https://www.cavallomagazine.it/>

Moxa accesa va una penna e dell'animale, a circa 2 cm dalla corrispondenza precedentemente descrivendo in senso orario. La che non sta deve essere in un'area più

Lo stimolo dato dal l'utilizzo di un sigaro



Immagine 2.2.2 Sigaro di Moxa e sua confezione

Controllo comporta Davidoff Signature

2000 spento.

Per applicare lo stimolo Controllo si effettuano gli stessi movimenti circolari appena descritti, in corrispondenza dello stesso punto e alla medesima distanza dalla superficie cutanea del Pony, con posizionamento della mano libera sul dorso dell'animale analogamente a quanto indicato per lo stimolo precedente.

Ciascuno viene sul soggetto per un minuti.

	Giornata		
	1	2	3
Gruppo 1	//	C	M
Gruppo 2	C	M	//

stimolo applicato da testare tempo di 10

Tabella 2.2.1 Schema degli stimoli applicati sui gruppi in ogni giornata di rilevazione

I Pony sono stati divisi in due gruppi per sorteggio, il cui esito è stato:

- GRUPPO 1: ID 2 e 4
- GRUPPO 2: ID 1 e 3

Le rilevazioni sono avvenute in tre giornate distinte secondo lo schema di seguito illustrato:



Immagine 2.2.4 Sigaro Davidoff Signature 2000. Immagine tratta dal sito <https://bottegadelfumatore.com/>

Da questo protocollo discende che:

- Ogni Cavallo viene testato alternativamente per un solo stimolo durante una singola rilevazione

- Ogni Cavallo viene testato per entrambi gli stimoli nel corso di due rilevazioni complessive
- L'ordine di applicazione degli stimoli da parte degli sperimentatori, nella giornata in cui sono stati effettuati entrambi i trattamenti, è: Controllo su 2 (DUE) soggetti, Moxibustione sui restanti 2 (DUE)¹
- L'ordine di applicazione dello stimolo ai soggetti appartenenti allo stesso Gruppo avviene per sorteggio prima di ogni rilevazione

2.3 Endpoints

L'esperimento prevede la rilevazione sui soggetti sperimentati dei seguenti parametri:

- Etogramma
- Frequenza cardiaca (di seguito FC)
- Termografia

Tali *Endpoints* vengono misurati precedentemente, in concomitanza e successivamente all'applicazione sull'agopunto *Bai hui* di due differenti stimoli:

Trattamento di Moxibustione indiretta (nel prosieguo Moxibustione) o Controllo.

Durante l'espletamento delle procedure di seguito descritte, si è annotato su supporto cartaceo l'orario di inizio e di fine di ogni rilevazione nonché il valore FC misurato in corrispondenza dei momenti indicati.

2.4 Strumenti di rilevazione e dati raccolti

La rilevazione dell'**etogramma** del soggetto testato avviene tramite acquisizione di una sequenza video da realizzarsi con videocamera 4K HD Action Camera HERO, mod. Ex-Hero V1.0, 2022. Le riprese video certificano altresì l'inizio di tutte le altre misurazioni, motivo per cui l'inquadratura è tale da

¹ La scelta di cominciare sempre con il controllo è dovuta al fatto che la Moxa rilascia sostanze volatili che verosimilmente rimangono percepibili nell'ambiente, costituendo un potenziale *bias* nelle rilevazioni sugli animali testati con il Controllo.

consentire la visione di tutte le procedure effettuate. La sequenza video inizia non appena il Pony viene agganciato ai due lati della capezza sui ganci presenti nell'area di posta adibita alle rilevazioni² e viene interrotta nel momento in cui cessano tutte le osservazioni sull'animale.

Per quanto riguarda l'**etogramma**, attraverso la visione delle immagini video si è proceduto alla valutazione dei comportamenti assunti dai soggetti sperimentali applicando su ogni minuto di registrazione due differenti scale, di seguito esposte, validate da recente letteratura.

La prima valutazione si rifà al seguente modello:

Stress level	Behaviour score	Behavioural indicators
No stress	1	Standing at the front of the stable, looking around or head below wither height, eating. Ears pricked, back or slowly scanning, tail still or gently swishing. Some repetitive oral behaviour. <i>Horse described as:</i> Horse calm, unconcerned, relaxed, quiet, listening, accepting.
	2	<i>Behaviour exhibited for previous BS plus:</i> Walking. <i>Horse also described as:</i> Horse alert and watching.
Low stress	3	<i>Behaviour exhibited for previous stress level plus:</i> Occasional weaving behaviour, box walking and repetitive head movements. Ears occasionally flattened. Defecation. <i>Horse described as:</i> Listening, interested, alert.
	4	<i>Behaviour exhibited for previous BS plus:</i> Pacing. Approaching potential stressors e.g. noise from outside the stable. Repeated tail swishing. <i>Horse also described as:</i> Curious, unsettled, barging.
Medium stress	5	<i>Behaviour exhibited for previous stress level plus:</i> Scratching against stable walls or fittings, pawing at ground with front legs. Nostrils flared. Repeatedly looking around. Tail raised. <i>Horse described as:</i> Restless, showing tension in the body, fidgeting when still.
	6	<i>Behaviour exhibited for previous BS plus:</i> Approaching and retreating away from potential stressors. Stopping eating to focus on potential stressor. <i>Horse also described as:</i> Jumpy, easily startled.
	7	<i>Behaviour exhibited for previous BS plus:</i> Keeping away from potential stressors and remaining still to focus on them. <i>Horse described as for previous BS.</i>
High stress	8	<i>Behaviour exhibited for previous stress level plus:</i> Repeated performance of stereotypic behaviour e.g. weaving, box walking repetitive head movements. Stamping of hind feet. Snorting. <i>Horse described as:</i> Very unsettled and alert.
	9-10	<i>Behaviour as exhibited for previous BS.</i> <i>Horse also described as:</i> Agitated, fidgety, anxious, active, aggressive, uncomfortable (McDonnell et al., 1999; Strand et al., 2002).

Tabella 2.4.1 Schema proposto da Young et al. nell'articolo *A novel scale of behavioural indicators of stress for use with domestic horses*, 2012, tabella 4

² L'aggancio avviene con due lunghine sufficientemente lunghe da consentire all'animale di espletare movimenti spontanei con la testa e con il corpo restando nell'inquadratura tanto della videocamera quanto della termocamera (si veda *infra*).

Per ogni minuto di registrazione si è attribuito un punteggio al comportamento esplicitato dall'animale, ottenendo in tal modo dei **valori su scala continua** indicativi del livello di stress dimostrato. In base alla scala in parola, un punteggio tanto più alto è indicativo di un più alto livello di stress. Si è quindi calcolata su ogni animale e **per ciascun trattamento (Controllo e Moxibustione)** la media dei punteggi ricevuti e la media dei punteggi per ciascuna fase di osservazione, ossia: **Pre-trattamento, Trattamento e Post-trattamento.**

Un altro tipo di analisi etologica è stata effettuata applicando le categorizzazioni di seguito proposte, che, correlando misurazioni fisiologiche e azioni manifestate dai Cavalli, suddividono l'etogramma equino in tre stati emotivi: **Agitated, Relaxed e Ambiguous.**

Category	Behavior	Behavioral description
Agitated	Clamped tail	The duration of time the tail was clamped tight against rump
	Ears back	The duration of time the ears were backward, pinna facing back while still visible (Figure 2a)
	Ears flat back	The duration of time the ears were held back against the poll area
	Head above	The duration of time the entire head including the muzzle was above withers
	Open mouth	The duration of time the mouth was open; lips may be drawn back to show teeth (Figure 2b)
	Raised tail	The duration of time the tail was held higher than natural position and with higher muscle tone
	Reefing on the reins	The total number of time there was a distinct pull against the reins: forward, downward, or in combination
	Shake	The total number of times a period of head shaking, side to side, occurred: one shake was defined as the head moving center-side-opposite side-center
	Stepping backward	The duration of time the horse was stepping backward: one step or multiple steps
	Stepping forward	The duration of time the horse was stepping forward: either one step, multiple steps, or pawing
	Tail swishing	The duration of time the tail was moving side to side (Figure 2c)
	Total above and below (Total AB)	The total number of times head was above or below withers
	Total forward and back (FB)	The total of all steps taken forward and backward
	Total head movements	The total number of head movements above and below the withers and left and right of the midline
White sclera	The duration of time of exposure of the white sclera around the eye	

Relaxed	Closed mouth	The duration of time mouth was closed, no teeth showing
	Elongation upper lip	The duration of time of lengthening the upper lip (Figure 2d)
	Head below	The duration of time the entire head including the ears was below withers in context of relaxation
	Head level	The duration of time the head was level with ears above the withers and muzzle below the withers
	Long snorting	The total number of times there was a long drawn-out snorting/ sneezing (not to be confused with a short, sharp snort)
Ambiguous	Neutral ears	The duration of time when the pinna of both ears were facing outward (Figure 2e)
	Standing	The duration of time standing stationary with no leg movement
	Ears forward	The duration of time with ears forward; pinna facing forward (Figure 2f)
	Head left	The duration of time the head, which may include the neck, was turned to the left
	Head right	The duration of time the head, which may include the neck, was turned to the right
	Left-ear lateralization	The duration of time the left-ear pinna was facing forward and right-ear pinna was facing backward (Figure 2g)
	Licking–chewing	The total number of times licking the lips while performing a chewing motion
	Right-ear lateralization	Right-ear pinna facing forward and left-ear pinna facing backward (Figure 2h)
	Total ear	The total of all ear movements during each treatment
	Total left and right (LR)	The total number of times head turned left or right or both
	Tongue out	The duration of the tongue protruding straight out or on either side of the mouth (Figure 2i)
Yawning	The number of times the mouth was open to fullest extent, exposing incisors and tongue	

Tabella 2.4.2 Modello di analisi etologica per categorizzazioni pubblicato da Thorbergson et al. in *Physiological and Behavioral Responses of Horses to Wither Scratching and Patting the Neck When Under Saddle*, 2016, tabella 2

Le registrazioni ottenute durante l'osservazione sperimentale sono state visionate attribuendo una categoria di appartenenza, di minuto in minuto, ai comportamenti espletati da ciascun soggetto, in ognuno degli esperimenti condotti. Il dato estraibile da siffatta valutazione è un conteggio relativo al numero di minuti in cui ogni animale ha manifestato comportamenti principalmente ascrivibili a uno stato emotivo agitato, rilassato o ambiguo, relativamente alla durata totale dell'osservazione e in ogni singola fase dell'esperimento.

La **frequenza cardiaca (FC)** è stata rilevata all'inizio di ogni osservazione, all'inizio e alla fine dell'applicazione dello stimolo e alla fine dell'osservazione, utilizzando un fonendoscopio Littmann Classic e auscultando l'area di proiezione dell'itmo cardiaco dell'animale per 30 secondi. Il conteggio dei battiti così ottenuto veniva poi moltiplicato X2 per ottenere la stima dei battiti per minuto. Nel momento in cui la FC del Cavallo raggiungeva il valore soglia di 40 bpm o risultava inferiore a tale limite, si dava avvio alla rilevazione termografica sull'animale.

La **termografia** è stata ottenuta per mezzo di termocamera InfraRed Camera R500EX-Pro (2016) in dotazione al Laboratorio di Etologia Applicata del Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione dell'Università degli Studi di Padova. Le impostazioni utili ai fini della raccolta dati del presente lavoro sono:

- Acquisizione di un'immagine al secondo
- Raccolta di 2000 immagini per ogni sessione avviata
- Tempo di registrazione automatica di 33 minuti

Dopo 5 minuti dall'avvio della termocamera, effettuata la rilevazione della FC, si procede all'applicazione dello stimolo in base al protocollo stabilito per 10 minuti.

Dalla fine dell'applicazione dello stimolo si cronometrano 20 minuti al termine dei quali si può considerare terminata la rilevazione sul singolo soggetto, interrompendo dunque le misurazioni in corso (fototermometrica e video).

Dal momento che il tempo di registrazione delle termoimmagini con le impostazioni descritte produce automaticamente video della durata massima di 33 minuti mentre il disegno sperimentale prevede un'osservazione totale di 35 minuti, l'operatore incaricato del monitoraggio della termocamera procedeva all'avvio di un nuovo video nel momento in cui il numero di immagini acquisite (dato costantemente aggiornato sull'interfaccia del monitor) raggiungeva le 2000 unità. Si ritiene che il possibile scarto di un secondo dovuto all'errore umano non infici la validità della rilevazione, considerando che i momenti scelti per la selezione di singole termoimmagini non comprendevano il minuto di stacco (si veda *Infra*).

La valutazione termografica è stata quindi svolta con il programma IRT Cronista 4.0 (GRAYESS, 2022) partendo da 20 termoimmagini per ogni osservazione, registrate in momenti prestabiliti e non equidistanti, come riportato in figura:

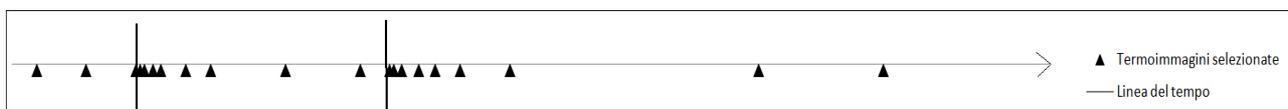


Grafico 2.4.1 Rappresentazione schematica dei momenti di acquisizione delle termoimmagini (cursori triangolari). La linea orizzontale esprime idealmente la continuità temporale dell'esperimento, mentre le linee verticali indicano i momenti di inizio e di fine dell'applicazione dello stimolo. La frequenza di rilevazione termometrica immediatamente successiva a questi due momenti segue una progressione geometrica decrescente

Tale individuazione arbitraria dei momenti di selezione ricalca l'esigenza di osservazioni a frequenza ravvicinata all'inizio e alla fine dell'applicazione dello stimolo, frequenza che viene portata gradualmente a decrescere secondo una progressione numerica geometrica.

Al fine di massimizzare la qualità delle termoeffimmagini, ogni fotogramma così individuato è stato confrontato con i 3 precedenti e i 3 seguenti per valutarne la nitidezza e scegliere per ogni momento l'immagine migliore in un intorno di ± 3 secondi.

Da ogni immagine scelta sono state quindi selezionate, attraverso una specifica funzione del programma, due aree di forma ovale in corrispondenza della regione della caruncola lacrimale (Area A) e della zona compresa tra le narici (Area B). Per ognuna di queste zone è stato preso in considerazione il punto registrante la temperatura massima. Il totale dei rilievi analizzati è di 320 (2 aree su 20 termoeffimmagini in 8 esperimenti).

Al fine di rendere confrontabili temperature corporee rilevate in periodi dell'anno e momenti della giornata differenti, si è proceduto alla normalizzazione della temperatura media ambientale rilevata nel primo fotogramma di ogni osservazione, ottenendo così un indice di conversione della temperatura, da applicare per differenza alle singole temperature di area secondo lo schema sottostante:

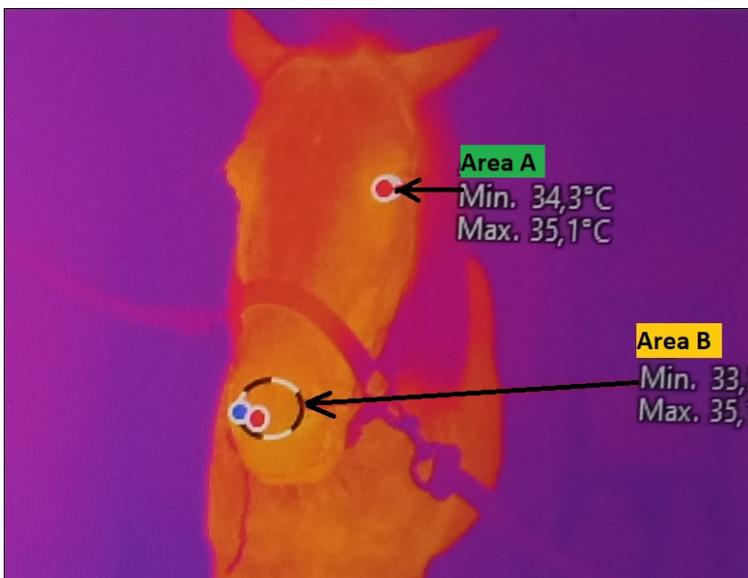


Immagine 2.4.1 Termoeffimagine elaborata attraverso l'applicativo IRT Cronista. Nel dettaglio, vengono selezionate due aree: area A (caruncola lacrimale) e area B (regione tra le narici)

	media	24,7		
	dev.st	6,87		
exp	t ambient	t amb N	F. di conversione	
ctrl 1	13,9	-1,6		1,6
ctrl 2	26,1	0,2		-0,2
ctrl 3	15,0	-1,4		1,4
ctrl 4	25,8	0,2		-0,2
moxa 1	26,5	0,3		-0,3
moxa 2	31,8	1,0		-1,0
moxa 3	25,5	0,1		-0,1
moxa 4	32,6	1,2		-1,2

Tabella 2.4.3 Fattori di conversione delle temperature corporee sulla base della normalizzazione delle temperature ambientali

2.5 Analisi

statistica

L'analisi statistica è stata condotta con programma di analisi R (versione 3.6.1, 2019).

Lo schema di analisi ha riguardato:

- Analisi sui dati relativi all'etogramma valutato con i due metodi sopra esposti
- Analisi dei dati termici
- Analisi integrata dei due tipi di dati (Etogramma e Temperatura)

2.5.1 Analisi dell'etogramma

In primo luogo è stato condotto un test t delle coppie corrispondenti (variante del test t di Student per tenere conto del fatto che ogni soggetto abbia ricevuto entrambi i trattamenti) sui dati medi di ciascuna fase dei punteggi su scala continua attribuiti, per verificare l'esistenza di una differenza statisticamente significativa tra le singole fasi (Pre-trattamento, Trattamento e Post-trattamento) nei due diversi trattamenti (Controllo vs Moxibustione). In secondo luogo lo stesso test è stato utilizzato per comparare i punteggi ottenuti in media durante l'intera osservazione nei due diversi trattamenti (Controllo vs Moxibustione).

Quindi si è voluto ritestare l'esistenza di una differenza statisticamente significativa tra i punteggi dei due trattamenti (Controllo vs Moxibustione) anche

attraverso un test dei ranghi di Wilcoxon per campioni appaiati. L'approccio per campioni appaiati considera la dipendenza tra le misurazioni effettuate sugli stessi animali nei due trattamenti. Anche in questo caso il confronto ha riguardato le varie fasi (Pre-trattamento, Trattamento e Post-trattamento) e le osservazioni medie riferite all'intera durata dell'osservazione.

Inoltre è stato condotto un test Chi Square di Pearson sui dati relativi alla distribuzione di frequenza delle tre categorie Relaxed, Ambiguous, Agitated per confrontare i due diversi trattamenti (Controllo vs Moxibustione), per ciascuna fase (Pre-trattamento, Trattamento e Post-trattamento) e in sommatoria riferiti alle osservazioni per l'intera durata dell'esperimento.

2.5.2 Analisi dei dati termici

Per ogni area di osservazione termografica (A e B), è stata applicata un'analisi ANOVA a misure ripetute sulle temperature corrette in base alla temperatura esterna. La temperatura è stata considerata variabile dipendente, mentre il tipo di trattamento, il momento e l'interazione tra trattamento e momento sono stati utilizzati come predittori. La variabile soggetto costituiva invece l'effetto casuale, così da tenere conto della possibile variabilità individuale. Questo allo scopo di verificare se ci fossero differenze significative nelle temperature tra i momenti (Pre-, durante, Post-trattamento) e tra i trattamenti (Controllo vs Moxibustione). L'approccio a misure ripetute considera la dipendenza tra le misurazioni effettuate sugli stessi animali nei due trattamenti e nei diversi momenti.

2.5.3 Analisi integrata di etogramma e dati termici

Per ogni area di osservazione termografica (A e B), si è proceduto all'applicazione del modello della correlazione di Spearman per verificare l'esistenza di una eventuale correlazione tra misure etologiche (usando il punteggio su scala continua) e dati termici corretti in base alla temperatura esterna nei due diversi trattamenti (Controllo vs Moxibustione).

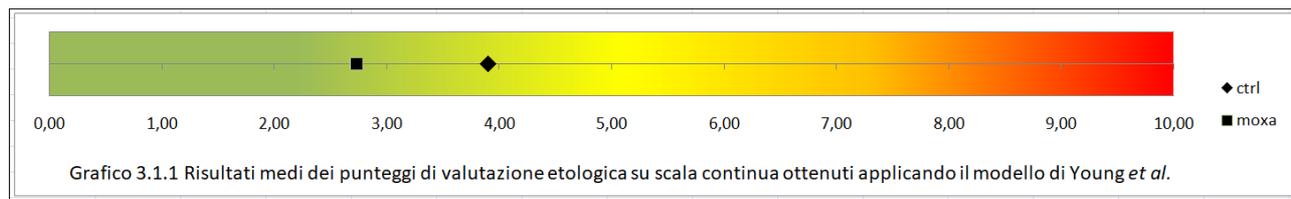
Ove fosse dimostrata una correlazione, si è proceduto al calcolo dell'intervallo di significatività della correlazione.

Infine, attraverso un'analisi ANCOVA a misure ripetute svolta per ognuna delle aree di osservazione termografica (A e B) si è inteso confrontare i due trattamenti (Controllo vs Moxibustione) sia in relazione al punteggio su scala continua derivante dalle valutazioni etologiche sia in relazione alla variazione termica misurata, includendo la media della temperatura per ogni fase e trattamento come covariata, mentre il trattamento (Controllo vs Moxibustione), la fase (Pre-, durante, Post-trattamento) e l'interazione tra trattamento e fase sono stati considerati come predittori. La variabile soggetto costituiva invece l'effetto casuale, così da tenere conto della possibile variabilità individuale. L'approccio a misure ripetute considera la dipendenza tra le misurazioni effettuate sugli stessi animali nei due trattamenti e nei diversi momenti.

3. Risultati e Discussione

3.1 Analisi dell'etogramma

L'analisi etologica condotta con il modello su scala continua di *Young et al.* ha prodotto i seguenti risultati medi:



La media dei punteggi relativi alla durata totale dell'esperimento è 3,90 per lo stimolo Controllo e 2,74 per lo stimolo Moxibustione.

Nello specifico, la distribuzione dei punteggi delle singole osservazioni assume la connotazione evidenziata dai sottostanti *boxplot*:

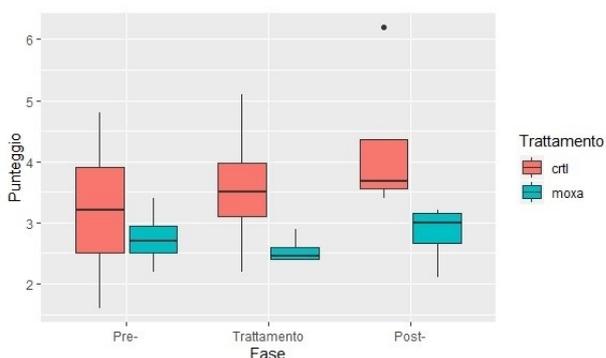


Grafico 3.1.2 Boxplot relativi alla distribuzione dei punteggi di valutazione etologica su scala continua ottenuti applicando il modello di *Young et al.* dettagliati per fase

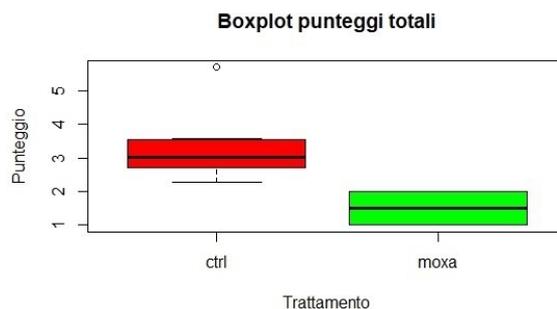


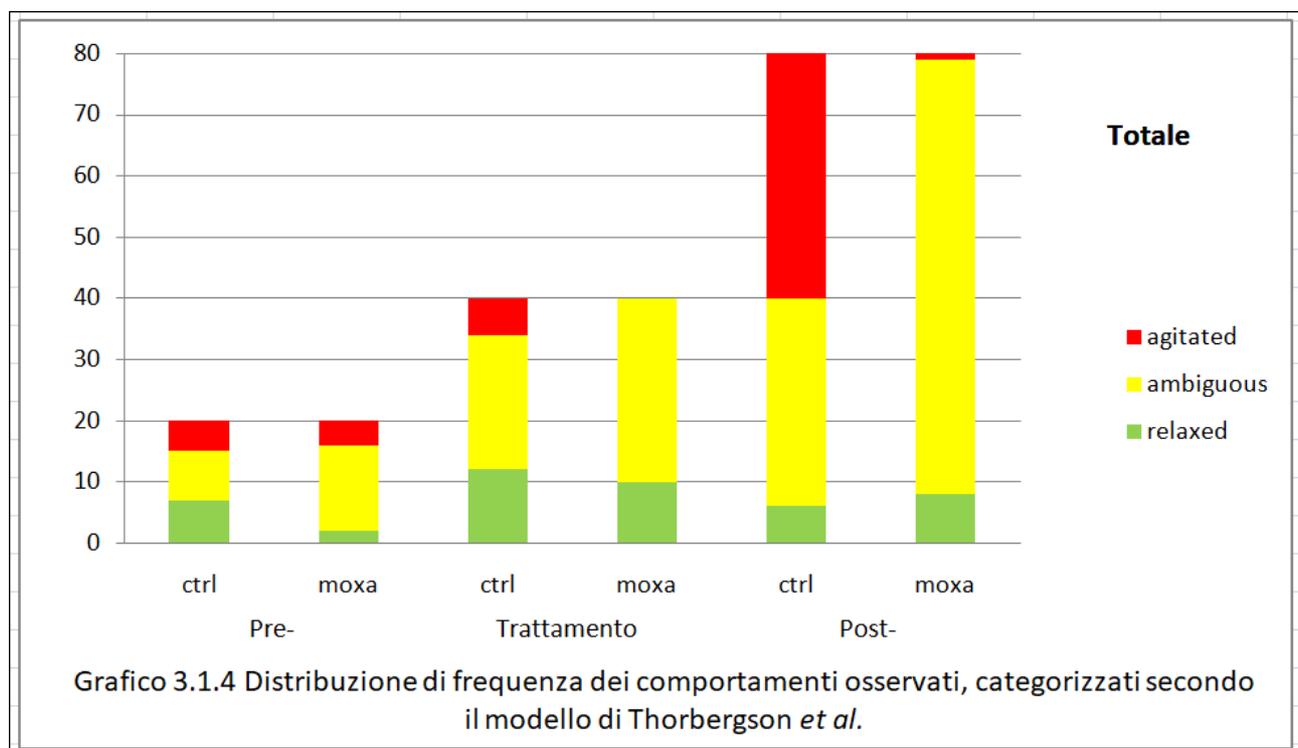
Grafico 3.1.3 Boxplot relativi alla distribuzione dei punteggi di valutazione etologica su scala continua ottenuti applicando il modello di *Young et al.*

L'analisi statistica con test t delle coppie corrispondenti applicata a questo set di dati non ha riscontrato una differenza statisticamente rilevante tra Controllo e Moxibustione in nessuna fase con un intervallo di confidenza del 95%. Il confronto tra le due fasi Pre-trattamento fa emergere il p value più alto, 0,3042. Tuttavia, vista l'esiguità del campione, è utile rilevare come dato tendenziale un

p value di 0,118219 nel confronto tra le due fasi di Trattamento e un **p value** di **0,072144** nel confronto tra le due fasi **Post-trattamento**. Con un intervallo di confidenza del 90% si riscontrerebbe dunque una differenza statisticamente significativa nella fase Post-trattamento. Tale differenza è in grado di assorbire il risultato delle due fasi precedenti, motivo per cui nel confronto tra i due trattamenti **complessivamente** considerati, con un **p value** di **0,0992**, riscontriamo nuovamente una differenza statisticamente significativa con un intervallo di confidenza del 90%.

Applicando a ritestare il set di dati con il test dei ranghi di Wilcoxon per campioni appaiati otteniamo valori di p value di 0,625 (Pre-trattamento), 0,25 (Trattamento), 0,125 (Post-trattamento) e 0,25 (Totale). Si constata dunque che applicando un test più robusto non emergono differenze statisticamente rilevanti tra i punteggi nei due differenti trattamenti.

L'analisi etologica per categorie attribuite sullo schema di Thorbergson *et al.* ha prodotto i risultati riportati nell'istogramma che segue:



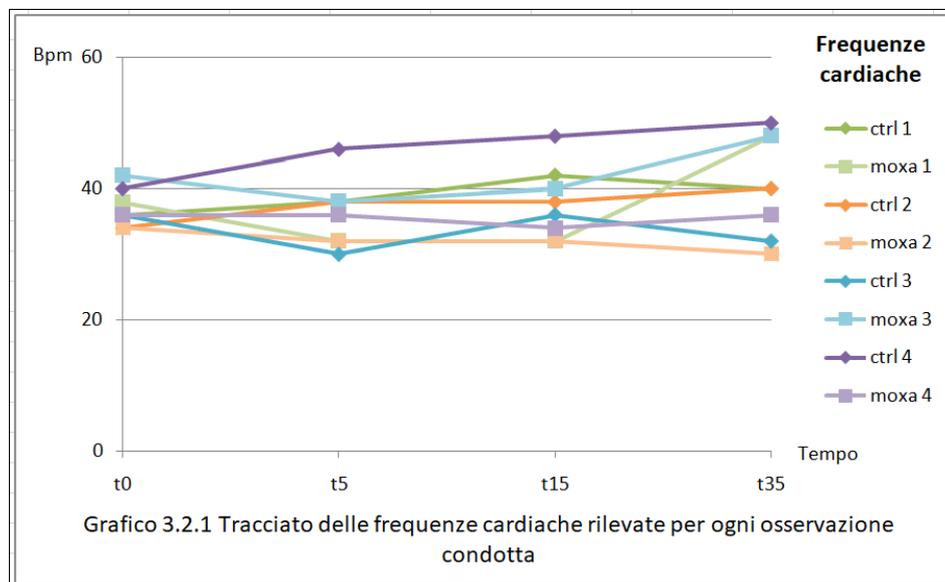
Su questo set di dati è stato condotto un test Chi Square di Pearson per confrontare i due tipi di trattamento. Soltanto nella fase Pre-trattamento, stante un p value di 0,1041 non si rileva una differenza statisticamente rilevante. Già nel confronto tra le fasi di applicazione dello stimolo (**Trattamento**) si delinea

una differenza statisticamente rilevante per un intervallo di confidenza del 95% con un **p value** pari a **0,02457**. La fase di osservazione **Post- trattamento** e il confronto riferito all'intera durata dell'esperimento (osservazioni sul **Totale**) esitano al contrario in differenze statistiche estremamente rilevanti, con valori p value rispettivamente di **1.125e-11** e **3.304e-12**.

In tutti i test effettuati nelle presenti analisi etologiche (anche considerando scale di valutazione operativamente diverse), non emerge alcuna differenza statisticamente rilevante nel confronto tra le due fasi preliminari, a possibile riprova della corretta conduzione dell'esperimento, che fino al tempo t5 prevedeva fasi identiche. Si denotano in seguito differenze maggiori tra i due trattamenti (Controllo e Moxibustione) con il procedere temporale delle fasi, indice di una plausibile evidenza degli effetti su un arco temporale più esteso (Chiu, 2013; Huang & Sheu, 2011; Li et al., 2023; Rodrigues et al., 2022; Soroko et al., 2016).

3.2 Osservazioni sui tracciati di Frequenza cardiaca

Per quanto riguarda la frequenza cardiaca, si osservano i seguenti tracciati:

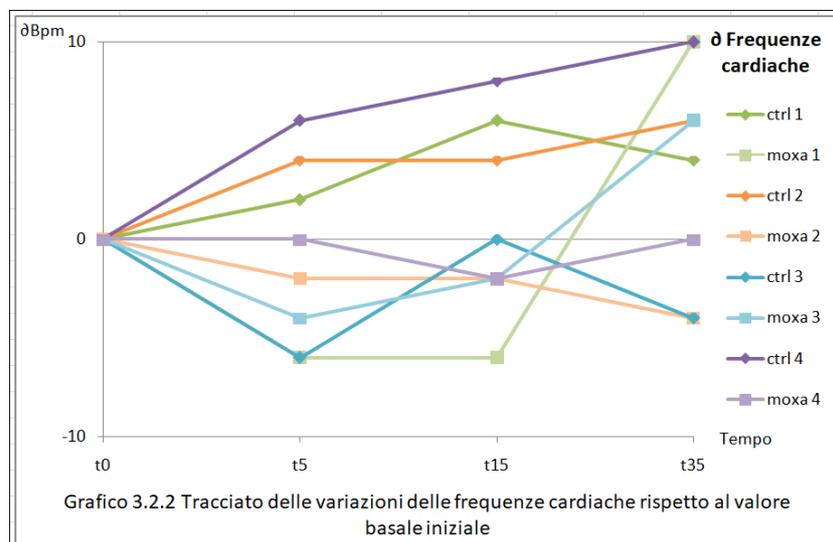


Vista l'estrema variabilità nell'andamento delle misurazioni in parola, si è optato per una rielaborazione grafica della variazione della frequenza cardiaca rispetto al valore basale misurato in t0:

I dati così rielaborati mettono in evidenza una diminuzione della frequenza cardiaca in t5 rispetto al valore basale in tutte le osservazioni in cui lo stimolo applicato era la Moxibustione. Tale rilievo potrebbe essere dovuto all'effetto dell'accensione del sigaro di moxa a pochi metri di distanza, da parte di un secondo operatore, durante la misurazione della frequenza cardiaca in t5; "l'effetto fumo" come variabile incidente è del resto riscontrato da autorevole letteratura (Chiu, 2013; Ha et al., 2019; Huang & Sheu, 2011; Li et al., 2023; Von Schweinitz, 1998). Solamente un soggetto ha registrato una diminuzione della frequenza cardiaca anche durante l'osservazione in Controllo, circostanza ascrivibile a una possibile sensibilità individuale a manipolazioni che possono mimare

grooming
al., 2015;
et al., 2003;
al., 2022).

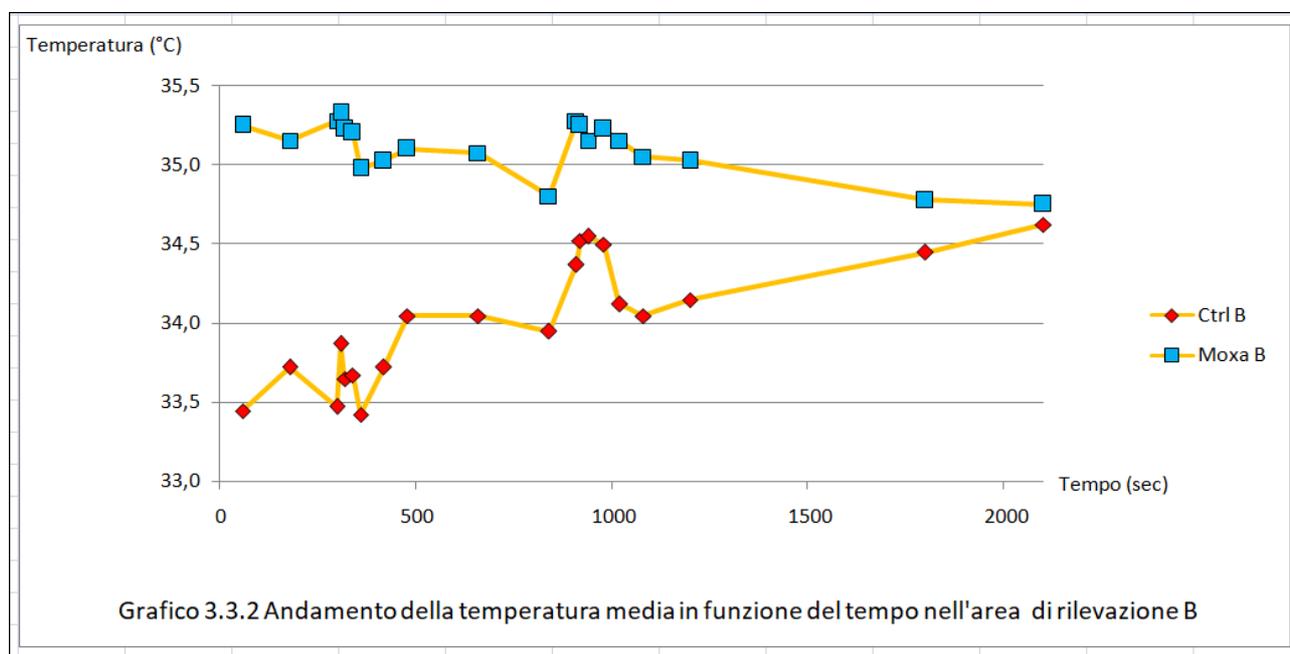
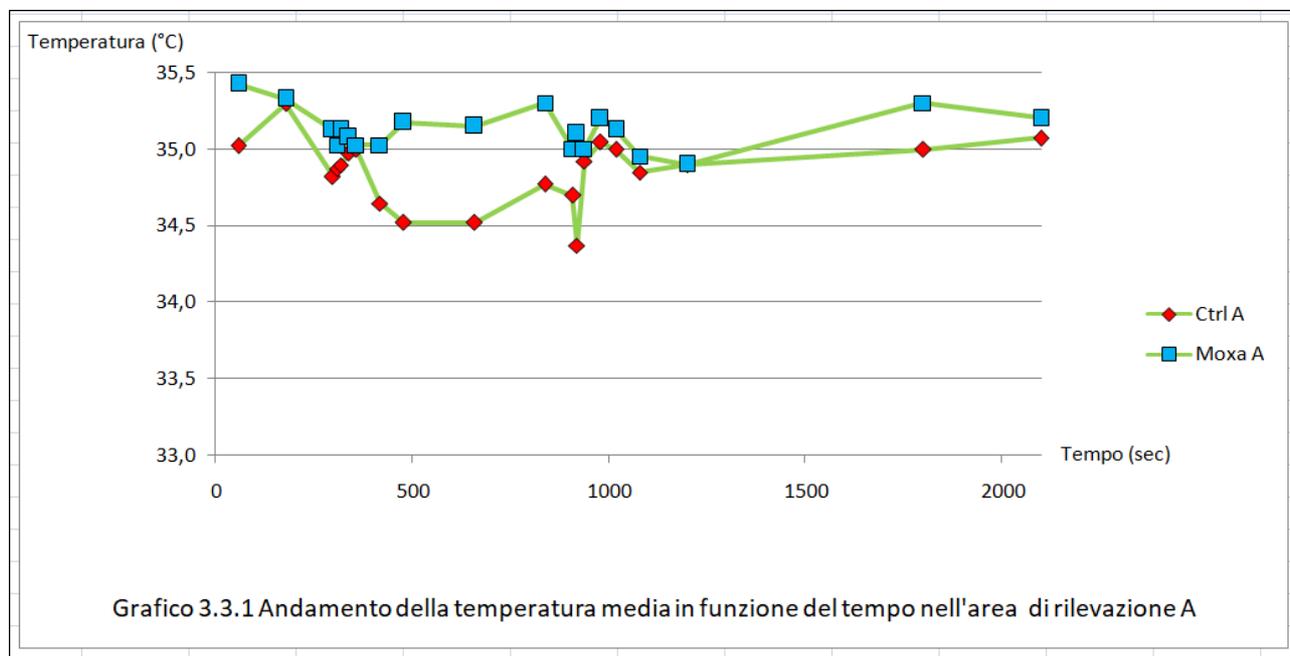
3.3 Analisi termici



un'attività di
(Minero et
Normando
Rodrigues et

dei dati

L'analisi termografica in relazione al tempo è visualizzabile nei due grafici riportati, riferiti alle misurazioni termometriche medie -corrette sulla base della temperatura ambientale- rilevate nell'area A (caruncola lacrimale) e nell'area B (regione tra le narici):



In entrambe le aree la Moxibustione produce un aumento della temperatura superficiale, coerente con la dimostrata capacità del trattamento in parola di indurre vasodilatazione (Chiu, 2013; Ha et al., 2019; Huang & Sheu, 2011; Li et

al., 2023). L'area A mette inoltre in evidenza un effetto immediato del trattamento di Moxibustione: nonostante un picco di temperatura nel momento in cui l'operatore inizia ad effettuare le manipolazioni, rilevato coerentemente anche in Controllo, all'inizio dell'applicazione dello stimolo di Moxibustione si assiste a un rapido accomodamento della temperatura, circostanza che suggerisce l'attivazione della componente parasimpatica del SNA (Chiu, 2013; Kim & Cho, 2021; Li et al., 2023).

Le osservazioni relative all'area B sono al contempo più difficilmente interpretabili, soprattutto alla luce del fatto che le temperature appaiono visibilmente differenti già nella fase Pre-trattamento. Una possibile spiegazione è che il limitato numero di soggetti sperimentati abbia fatto assumere a possibili valori outlier un peso rilevante. Del resto, la combinata valutazione dei dati in commento con le rilevazioni di frequenza cardiaca farebbe emergere l'esistenza di un soggetto con risposte autonome indicative di un basso arousal in corrispondenza di entrambi i tipi di manipolazione.

Tale differenza viene confermata dall'analisi ANOVA a misure ripetute riferita al confronto tra le temperature medie nelle diverse fasi (Pre-trattamento, Trattamento e Post-trattamento) eseguita in ognuna delle due sezioni. L'area A realizza un p value di 0,4071 (non statisticamente significativa). Sulla base di questo risultato, non possiamo concludere che né il trattamento, né il momento, né la loro interazione abbiano un effetto significativo sulla temperatura nel campione. Mentre l'analisi sull'**area B**, risultante in un **p value** pari a **0,09368** indica che il Trattamento ha un effetto marginalmente significativo sulla temperatura media, quindi potrebbe essere interessante ma non conclusivo al 5% di significatività. Con un intervallo di confidenza del 90% si otterrebbe una differenza statisticamente significativa tra la media delle temperature misurate al Controllo e la media di quelle misurate in Moxibustione.

3.4 Analisi integrata di etogramma e dati termici

Per verificare l'esistenza di una eventuale correlazione tra misure etologiche (esprese con il punteggio su scala continua) e dati termici -corretti in base alla temperatura esterna- nei due diversi trattamenti (Controllo vs Moxibustione) si è

ricorsi in ciascuna delle aree di indagine termografica (A e B) alla correlazione di Spearman.

In entrambe le aree la correlazione è statisticamente significativa se lo stimolo applicato è il **Controllo**, con p value pari a **0,05132** nell'area A (coefficiente di Spearman $\rho = 0,9486833$: correlazione forte e positiva) e p value pari a **0.08333** nell'area B (coefficiente di Spearman $\rho = 1$: correlazione perfettamente positiva).

Per quanto attiene alla Moxibustione, al contrario, si riscontrano p value pari a 0,75 nell'area A e 0,9167 nell'area B. Non esiste quindi una correlazione statisticamente significativa tra i valori risultanti dalla scala etologica utilizzata e le temperature misurate nelle osservazioni relative alla Moxibustione. Questo risultato induce a ritenere che la Moxibustione determini un disaccoppiamento tra valori di arousal stimati con il modello di Young e temperature corporee rilevate.

Svolgendo un'analisi ANCOVA a misure ripetute con le variabili precedentemente descritte emerge che in entrambe le aree solo il **trattamento** sembra avere un impatto significativo sul punteggio ottenuto dall'analisi etologica (p value **0,01795** nell'area A e **0.001839** nell'area B), mentre il momento, la temperatura media, e l'interazione tra trattamento e momento non hanno effetti significativi.

4. Conclusioni

Il presente studio si proponeva di indagare gli effetti autonomici della pratica di Moxibustione sugli Equidi attraverso l'osservazione dell'etogramma, la misurazione della frequenza cardiaca e la rilevazione dei dati termici prima, durante e dopo un trattamento di Moxibustione e nel confronto con un controllo dato da una stimolazione analoga al trattamento ma effettuata con un sigaro spento.

Dalle misurazioni ottenute e dall'analisi statistica condotta con test differenti, è emerso che l'analisi etologica mostra un certo grado di differenza rispetto al controllo, la cui rilevanza statistica dipende dal tipo di modello di valutazione etologica applicato e dalla robustezza dei test statistici impiegati. L'esiguità del campione può tuttavia aver determinato in maniera marginale una minore significatività dei risultati ottenuti. Dal confronto tra le due fasi di osservazione prodromiche all'applicazione dello stimolo (operativamente identiche), nessuno dei test condotti ha fatto emergere differenze statisticamente rilevanti, a possibile riprova della corretta conduzione dell'esperimento. Si denotano in seguito differenze via via maggiori tra i due trattamenti con il procedere temporale delle fasi, indice di una plausibile maggiore evidenza degli effetti della Moxibustione su un arco temporale più esteso (Chiu, 2013; Huang & Sheu, 2011; Li et al., 2023; Rodrigues et al., 2022; Soroko et al., 2016).

I tracciati di frequenza cardiaca e temperatura in funzione del tempo sono indicativi di una possibile attivazione della componente parasimpatica del sistema nervoso autonomo, già dimostrata peraltro da autorevole letteratura (Chiu, 2013; Kim & Cho, 2021; Li et al., 2023).

Uno dei quattro soggetti sperimentati sembra presentare una risposta autonoma di tipo parasimpatico molto più accentuata rispetto agli altri soggetti e indipendentemente dallo stimolo applicato. Ciò potrebbe essere dovuto a una maggiore sensibilità individuale alle manipolazioni eseguite (Minero et al., 2015; Normando et al., 2003; Rodrigues et al., 2022). Si ritiene che questa circostanza in un campione tanto ristretto possa aver influito su

alcuni valori di temperatura anomali riscontrati nella fase di controllo per il peso esercitato dagli outlier sul dato medio.

Inoltre, con riferimento alla sola misurazione termografica, appare evidente un aumento della temperatura superficiale indotto dalla Moxibustione su entrambe le aree anatomiche analizzate, compatibile con un effetto di vasodilatazione conseguente alla pratica della Moxibustione, già evidenziato in precedenti Studi (Chiu, 2013; Ha et al., 2019; Huang & Sheu, 2011; Li et al., 2023).

L'analisi integrata di etogramma e dati termici mette in luce la mancanza di una correlazione statisticamente significativa tra i valori risultanti dalla scala etologica utilizzata e le temperature misurate nelle osservazioni relative alla Moxibustione. Questo risultato induce a ritenere che la Moxibustione determini un disaccoppiamento tra valori di arousal stimati con il modello impiegato in questo tipo di analisi e temperature corporee rilevate.

Infine, mettendo in relazione tutte le variabili considerate nel disegno sperimentale, si evince che solo il trattamento sembra avere un impatto significativo sul punteggio ottenuto dall'analisi etologica, mentre il momento, la temperatura media, e l'interazione tra trattamento e momento non hanno effetti significativi sui riscontri etologici osservati.

In sintesi, nel presente studio la Moxibustione evidenzia effetti autonomici differenti da quelli prodotti dal controllo e compatibili con le risultanze della maggior parte della letteratura consultata.

Occorre al contempo evidenziare i limiti del presente lavoro, riscontrabili nel numero esiguo di soggetti sperimentati, nel comune background esperienziale degli stessi (che fa presumere una relativa abitudine alle manipolazioni eseguite nello studio in esame) e nella contenuta disponibilità di spazio nella sede delle rilevazioni, che ha determinato la necessità di legare i Pony a due lunghine limitandone parzialmente i movimenti, nonché l'impossibilità di accendere i sigari di moxa a una distanza congrua da far ritenere ininfluenza l'effetto del fumo, sui soggetti nei momenti immediatamente precedenti all'applicazione dello stimolo di Moxibustione.

Possibili spunti per analoghi studi futuri dovrebbero considerare la possibilità di utilizzare un campione statistico più numeroso ed eterogeneo in termini di

background, diverse scale di valutazione etologica, osservazioni su soggetti senza limitazioni di movimento. Anche l'impiego di diversi controlli negativi - valutati singolarmente o in combinazione- potrebbe aumentare a qualità delle ricerche svolte sull'argomento; si pensi ad esempio a un sigaro di moxa spento, a un sigaro di tabacco acceso, a oggetti morfologicamente simili al sigaro di moxa come penne o cannuce, o alla stimolazione di "finti agopunti" (Dai et al., 2023; Huang & Sheu, 2011; Muniem & Aljobory, 2017; Von Schweinitz, 1998)- effettuata in alcuni studi sperimentali recenti - o ancora alla valutazione del solo effetto del fumo della Moxibustione in assenza di manualità proprie di Medicina Tradizionale Cinese (Chiu, 2013; Ha et al., 2019; Huang & Sheu, 2011; Li et al., 2023; Von Schweinitz, 1998).

Bibliografia:

- Arfuso, F., Aciri, G., Piccione, G., Sansotta, C., Fazio, F., Giudice, E., & Giannetto, C. (2022). Eye surface infrared thermography usefulness as a noninvasive method of measuring stress response in sheep during shearing: Correlations with serum cortisol and rectal temperature values. *Physiology and Behavior*, 250. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113781>
- Bufalari, A., & Lachin, A. (2012). *Anestesia Cane, Gatto e Animali Non Convenzionali*. Elsevier.
- Chiu, J. H. (2013). How does moxibustion possibly work? In *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* (Vol. 2013). <https://doi.org/10.1155/2013/198584>
- Church, J. S., Hegadoren, P. R., Paetkau, M. J., Miller, C. C., Regev-Shoshani, G., Schaefer, A. L., & Schwartzkopf-Genswein, K. S. (2014). Influence of environmental factors on infrared eye temperature measurements in cattle. *Research in Veterinary Science*, 96(1), 220–226. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.006>
- Cook, N. J. (2001). *Adrenocortical and metabolic responses to ACTH injection in horses: an assessment by salivary cortisol and infrared thermography of the eye*. <https://www.researchgate.net/publication/310749139>
- Daglish, J., le Jeune, S. S., Pypendop, B. H., Ramirez, E. M., & Turner, T. A. (2017). Use of Infrared Thermography to Detect Jugular Venipuncture in the Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 59, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.09.003>
- Dai, S., Shiao, D.-S., Zilberschtein, J., & Xie, H. (2023). *Clinical Studies Correlation Between Acupuncture Point Sensitivity and Front Hoof Thermography in Horses: A Preliminary Investigation*. www.ajtcvm.org
- Dalla Costa, E., Bracci, D., Dai, F., Lebelt, D., & Minero, M. (2017). Do Different Emotional States Affect the Horse Grimace Scale Score? A Pilot Study. *Journal of Equine Veterinary Science*, 54, 114–117. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.03.221>
- Draaisma, R. (2018). *Language signs and calming signals of horses : recognition and application* (1st ed.). CRC Press.
- Dyson, S., Berger, J. M., Ellis, A. D., & Mullard, J. (2018). Behavioral observations and comparisons of nonlame horses and lame horses before and after resolution of lameness by diagnostic analgesia. *Journal of Veterinary Behavior*, 26, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2018.05.001>
- Esteves Trindade, P. H., de Camargo Ferraz, G., Pereira Lima, M. L., Negrão, J. A., & Paranhos da Costa, M. J. R. (2019). Eye Surface Temperature as a Potential Indicator of Physical Fitness in Ranch Horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 75, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.11.015>
- Foster, S., & Ijichi, C. (2017a). The association between infrared thermal imagery of core eye temperature, personality, age and housing in cats. *Applied Animal Behaviour Science*, 189, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.01.004>
- Foster, S., & Ijichi, C. (2017b). The association between infrared thermal imagery of core eye temperature, personality, age and housing in cats. *Applied Animal Behaviour Science*, 189, 79–84. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2017.01.004>

- Gaidano, B., & Pozzi, R. (2020). *IMPIEGO CLINICO DELLA MOXA NEL GATTO Clinical Use of Moxa in Cats*.
- Gleerup, K. B., Andersen, P. H., & Wathan, J. (2018). What information might be in the facial expressions of ridden horses? Adaptation of behavioral research methodologies in a new field. In *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research* (Vol. 23, pp. 101–103). Elsevier USA.
<https://doi.org/10.1016/j.jveb.2017.12.002>
- Ha, L., Yu, M., Yan, Z., Rui, Z., & Zhao, B. (2019). Effects of Moxibustion and Moxa Smoke on Behavior Changes and Energy Metabolism in APP/PS1 Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
<https://doi.org/10.1155/2019/9419567>
- Hall, C., Kay, R., Randle, H., Preshaw, L., Pearson, G., & Waran, N. (2019). Indicators on the Outside: Behaviour and Equine Quality of Life. *15th International Equitation Science Conference*.
- Hintze, S., Smith, S., Patt, A., Bachmann, I., & Würbel, H. (2016). Are eyes a mirror of the soul? What eye wrinkles reveal about a horse's emotional state. *PLoS ONE*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164017>
- Huang, C., & Sheu, T. W. H. (2011). Study of the Heat Transfer Effect in Moxibustion Practice. In M. A. Dr. Dos Santos Bernardes (Ed.), *Developments in Heat Transfer*. InTech.
<http://www.intechopen.com/books/developments-in-heat-transfer/study-of-the-heattransfer-effect-in-moxibustion-practice>
- Ijichi, C., Evans, L., Woods, H., & Yarnell, K. (2020). The Right Angle: Validating a standardised protocol for the use of infra-red thermography of eye temperature as a welfare indicator. *Animal Welfare*, 29(2), 123–131.
<https://doi.org/10.7120/09627286.29.2.123>
- Janczarek, I., Kędzierski, W., Stachurska, A., Wilk, I., Kolstrung, R., & Strzelec, K. (2016). Autonomic nervous system activity in purebred Arabian horses evaluated according to the low frequency and high frequency spectrum versus racing performance. *Acta Veterinaria Brno*, 85(4), 355–362.
<https://doi.org/10.2754/avb201685040355>
- Jansson, A., Lindgren, G., Velie, B. D., & Solé, M. (2021). An investigation into factors influencing basal eye temperature in the domestic horse (*Equus caballus*) when measured using infrared thermography in field conditions. *Physiology and Behavior*, 228. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113218>
- Jensen, P., & Toates, F. M. (1997). Stress as a state of motivational systems. In *Applied Animal Behaviour Science* (Vol. 53).
- Johnson, S. R., Rao, S., Hussey, S. B., Morley, P. S., & Traub-Dargatz, J. L. (2011). Thermographic Eye Temperature as an Index to Body Temperature in Ponies. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(2), 63–66. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2010.12.004>
- Kim, S. M., & Cho, G. J. (2021). Validation of eye temperature assessed using infrared thermography as an indicator of welfare in horses. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(16).
<https://doi.org/10.3390/app11167186>
- Koolhaas, J. M., De Boer, S. F., & Bohus, B. (1997). Motivational systems or motivational states: Behavioural and physiological evidence. In *Applied Animal Behaviour Science* (Vol. 53).
- Kreibig, S. D. (2010). Autonomic nervous system activity in emotion: A review. *Biological Psychology*, 84(3), 394–421. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.03.010>

- Lees, A. M., Salvin, H. E., Colditz, I. G., & Lee, C. (2020). The influence of temperament on body temperature response to handling in angus cattle. *Animals*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/ani10010172>
- Li, J., Gao, Y., Yan, J., & Guo, X. (2023). Research progress of moxa smoke. *International Journal of Frontiers in Medicine*, 5(6). <https://doi.org/10.25236/ijfm.2023.050616>
- Mccafferty, D. J., Moncrieff, J. B., Taylor, I. R., & Boddie, G. F. (n.d.). *THE USE OF IR THERMOGRAPHY TO MEASURE THE RADIATIVE TEMPERATURE AND HEAT LOSS OF A BARN OWL (TYTO ALBA)*.
- Minero, M., Dalla Costa, E., Dai, F., Canali, E., Barbieri, S., & Zanella, A. (2015). *Protocollo AWIN di valutazione del benessere dei cavalli*.
- Montanholi, Y. R., Odongo, N. E., Swanson, K. C., Schenkel, F. S., McBride, B. W., & Miller, S. P. (2008). Application of infrared thermography as an indicator of heat and methane production and its use in the study of skin temperature in response to physiological events in dairy cattle (*Bos taurus*). *Journal of Thermal Biology*, 33(8), 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2008.09.001>
- Mullard, J., Berger, J. M., Ellis, A. D., & Dyson, S. (2017). Development of an ethogram to describe facial expressions in ridden horses (FEReq). *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, 18, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2016.11.005>
- Muniem, A., & Aljobory, I. S. (2017). Effectiveness the Acupuncture and Electroacupuncture in the Treatment of Delayed Onset Muscle Soreness in Racing Horses: Comparative Study. In *Kufa Journal For Veterinary Medical Sciences* (Issue 8).
- Normando, S., Haverbeke, A., Meers, L., Odberg, F. O., Ibàñez Talegòn, M., & Bono, G. (2003). Effect of Manual Imitation of Grooming on Riding Horses' Heart Rate in Different Environmental Situations. *Veterinary Research Communications*, 27(Suppl. 1), 615–617.
- Pearson, G., Waran, N., Reardon, R. J. M., Keen, J., & Dwyer, C. (2021). A Delphi study to determine expert consensus on the behavioural indicators of stress in horses undergoing veterinary care. *Applied Animal Behaviour Science*, 237. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2021.105291>
- Phillips, P. K., & Heath, J. E. (1995). DEPENDENCY OF SURFACE TEMPERATURE REGULATION ON BODY SIZE IN TERRESTRIAL MAMMALS. In *J. therm. Biol* (Vol. 20, Issue 3).
- Phillips, P. K., & Heath, J. E. (2001). An infrared thermographic study of surface temperature \dot{z} / in the euthermic woodchuck *Marmota monax*. In *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* (Vol. 129).
- Rodrigues, P. G., Freitas, L. M. D., de Oliveira, K., Martins, C. O. D., Silva, C. M., de Oliveira, C. G., Lima Júnior, J. W. R., & Velarde, J. M. D. S. (2022). Thermal and behavioral response of horses submitted to functional exercises and acupuncture. *Ciencia Rural*, 52(2). <https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20201046>
- Sánchez, M. J., Bartolomé, E., & Valera, M. (2016). Genetic study of stress assessed with infrared thermography during dressage competitions in the Pura Raza Español horse. *Applied Animal Behaviour Science*, 174, 58–65. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.11.006>
- Schoen, A. M. (2001). *Veterinary Acupuncture. Ancient Art to Modern Medicine* (J. A. Schrefer, L. L. Duncan, & T. Merchant, Eds.; 2nd ed.). Mosby.

- Sjaastad, O. V., Sand, I., & Hove, K. (2013). *Fisiologia degli animali domestici* (C. Tamanini, Ed.; 2nd ed.). Casa Editrice Ambrosiana.
- Soroko, M., & Howell, K. (2018). Infrared Thermography: Current Applications in Equine Medicine. In *Journal of Equine Veterinary Science* (Vol. 60, pp. 90-96.e2). W.B. Saunders.
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.11.002>
- Soroko, M., Howell, K., Zwyrzykowska, A., Dudek, K., Zielińska, P., & Kupczyński, R. (2016). Maximum Eye Temperature in the Assessment of Training in Racehorses: Correlations With Salivary Cortisol Concentration, Rectal Temperature, and Heart Rate. *Journal of Equine Veterinary Science*, 45, 39–45.
<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.005>
- Squibb, K., Griffin, K., Favier, R., & Ijichi, C. (2018). Poker Face: Discrepancies in behaviour and affective states in horses during stressful handling procedures. *Applied Animal Behaviour Science*, 202, 33–34.
- Stewart, M., Webster, J. R., Schaefer, A. L., Cook, N. J., & Scott, S. L. (2005). Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. *Animal Welfare*, 14(4), 319–325.
<https://doi.org/10.1017/s096272860002964x>
- Stewart, M., Webster, J. R., Verkerk, G. A., Schaefer, A. L., Colyn, J. J., & Stafford, K. J. (2007). Non-invasive measurement of stress in dairy cows using infrared thermography. *Physiology and Behavior*, 92(3), 520–525. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.04.034>
- St-Pierre, N. R., Cobanov, B., & Schnitkey, G. (2003). Economic losses from heat stress by US livestock industries1. *Journal of Dairy Science*, 86(SUPPL. 1). [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74040-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5)
- Stucke, D., Große Ruse, M., & Lebelt, D. (2015). Measuring heart rate variability in horses to investigate the autonomic nervous system activity - Pros and cons of different methods. In *Applied Animal Behaviour Science* (Vol. 166, Issue 1, pp. 1–10). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.02.007>
- Travain, T., & Valsecchi, P. (2021). Infrared thermography in the study of animals' emotional responses: A critical review. In *Animals* (Vol. 11, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ani11092510>
- Valera, M., Bartolomé, E., Sánchez, M. J., Molina, A., Cook, N., & Schaefer, A. (2012). Changes in Eye Temperature and Stress Assessment in Horses During Show Jumping Competitions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(12), 827–830. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.03.005>
- Von Schweinitz, D. G. (1998). Thermographic evidence for the effectiveness of acupuncture in equine neuromuscular disease. *Acupuncture in Medicine*, 16(1), 14–17. <https://doi.org/10.1136/aim.16.1.14>
- Wemelsfelder, F. (1997). The scientific validity of subjective concepts in models of animal welfare. In *Applied Animal Behaviour Science* (Vol. 53).
- Zachary, J. F., & McGavin, M. D. (2010). *Patologia veterinaria sistematica* (M. Castagnaro, A. Corradi, L. Mechelli, S. Papparella, & S. Pirino, Eds.; 4th ed.). Elsevier.