

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE EM TOUROS NELORE (*Bos taurus indicus*) SUBMETIDOS À ELETROEJACULAÇÃO

WOLFF CAMARGO MARQUES FILHO

Botucatu - SP
Outubro 2007

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DO ESTRESSE EM TOUROS NELORE (*Bos taurus indicus*) SUBMETIDOS À ELETROEJACULAÇÃO

WOLFF CAMARGO MARQUES FILHO

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

Orientador: Prof. Ass. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Botucatu - SP
Outubro 2007

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Wolff e Olinda por todo amor, apoio, dedicação
estímulo para continuar.*

*As minhas irmãs Rafaella e Marcella pelo carinho, amizade e
incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por permitir estar aqui fazendo o que eu gostamos e com as pessoas que amamos.

Ao professor João Carlos Pinheiro Ferreira, pela orientação, amizade e ensinamentos profissionais e pessoais.

Aos professores do Departamento de Reprodução Animal, Cezinande de Meira, Eunice Oba, Fernanda da C. Landim e Alvarenga, Frederico Ozanam Papa, Marco Antonio Alvarenga, Maria Denise Lopes, Nereu Carlos Prestes e Sony Dimas Bicudo pelo acolhimento e por estes anos de boa convivência e por sempre me ajudarem quando preciso.

À professora Eunice Oba pelos ensinamentos e colaboração durante às análises hormonais no Laboratório de Endocrinologia.

Ao querido amigo Frederico José Heitman, pela realização da análise estatística e pela paciência e boa vontade ao me ensinar.

À querida amiga Caroline Junko Fugihara, pela amizade, pela dedicação incondicional ao me ajudar durante o projeto e por se mostrar uma amiga incondicional.

Às queridas amigas Ana Livia Monteiro da Rocha e Myrna dos Santos, pela amizade, pela ajuda na realização do projeto e pelos bons momentos dessa caminhada.

Aos funcionários da pós-graduação da FMVZ, Denise, Maria e José, por toda a ajuda, paciência e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal, Edilson, Márcio, Walter, Tico e Cristina, pela colaboração, acolhimento e boa convivência.

Aos funcionários da Fazenda Experimental São Manoel, João Ratti Júnior e Ivo Donizeti Ferreira de Brito por colaborar para realização do nosso trabalho.

Aos amigos da Biblioteca do Campus, em especial à Marluci Bettini e à Enilze Volpato Nogueira, pelo acolhimento e amizade durante o curso de mestrado.

A todas as pessoas que conviveram comigo na FMVZ durante estes anos, e que direta ou indiretamente contribuíram para a minha história.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estaremos sempre começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar. Devemos fazer da interrupção um novo caminho, fazer da queda um passo de dança, do medo, uma ponte, e da procura, um encontro.”

(Fernando Sabino)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Freqüência de abaixamento de cabeça, proporção e proporção estimada da freqüência de abaixamento de cabeça dos animais dos grupos Controle e Estresse no período pré-contenção durante as semanas experimentais	26
TABELA 2	Freqüência de lambidas no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	27
TABELA 3	Freqüência de cabeçadas no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	28
TABELA 4	Freqüência de coices no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	29
TABELA 5	Freqüência de defecações no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	30
TABELA 6	Freqüência de fugas no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	31
TABELA 7	Freqüência de micções no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	32
TABELA 8	Freqüência de mugidos no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	33
TABELA 9	Valores médios e erros padrão da freqüência respiratória, (movimentos por minuto) freqüência respiratória estimada, proporção e proporção estimada da freqüência respiratória dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais	35
TABELA 10	Valores médios e erros padrão da freqüência cardíaca (batimentos por minuto) da primeira avaliação do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	36

TABELA 11	Valores médios e erros padrão da temperatura retal (°C), temperatura retal estimada, proporção e proporção estimada da temperatura retal dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais	37
TABELA 12	Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de cortisol (ng/mL) da primeira avaliação do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	38
TABELA 13	Valores médios e erros padrão da concentração plasmática da progesterona (ng/mL) da primeira avaliação do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	39
TABELA 14	Frequência de vocalizações no período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	40
TABELA 15	Frequência de atitudes de deitar no período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	41
TABELA 16	Frequência de exposições penianas e da glândula peniana no período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	42
TABELA 17	Valores médios e erros padrão da frequência respiratória (movimentos por minuto), frequência respiratória estimada, proporção e proporção estimada da frequência respiratória dos animais dos grupos Controle e Estresse da segunda avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais	43
TABELA 18	Valores médios e erros padrão da frequência cardíaca (batimentos por minuto), frequência cardíaca estimada, proporção e proporção estimada da frequência cardíaca dos animais dos grupos Controle e Estresse da segunda avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais	44

TABELA 19	Valores médios e erros padrão da temperatura retal (°C) dos animais dos grupos Controle e Estresse da segunda avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais	45
TABELA 20	Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de cortisol (ng/mL) da primeira e segunda avaliações do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	47
TABELA 21	Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de progesterona (g/mL) da primeira e segunda avaliações do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	49
TABELA 22	Frequência de abaixamento de cabeça no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	51
TABELA 23	Frequência de lambidas no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	52
TABELA 24	Frequência de cabeçadas no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	53
TABELA 25	Frequência de coices no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	54
TABELA 26	Frequência de defecações no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	55
TABELA 27	Frequência de fugas no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	56
TABELA 28	Frequência de micção no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	57
TABELA 29	Frequência de salivação moderada no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	58

TABELA 30	Frequência, somatória da frequência de salivação excessiva, proporção e proporção estimada da frequência de salivação excessiva dos animais dos grupos Controle e Estresse no período pós-contenção durante as semanas experimentais	59
TABELA 31	Frequência de mugidos no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	60

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Freqüência de abaixamento de cabeça dos animais dos grupos Controle e Estresse no período pré-contenção durante as semanas experimentais	27
FIGURA 2	Freqüência de lambidas no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	28
FIGURA 3	Freqüência de cabeçadas no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	29
FIGURA 4	Freqüência de coices no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	30
FIGURA 5	Freqüência de defecações no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	31
FIGURA 6	Freqüência de fugas no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	32
FIGURA 7	Freqüência de micções no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	33
FIGURA 8	Freqüência de mugidos no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	34
FIGURA 9	Valores médios e erros padrão da freqüência respiratória (movimentos por minuto) dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais	35
FIGURA 10	Valores médios e erros padrão da freqüência cardíaca (batimentos por minuto) da primeira avaliação do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	36
FIGURA 11	Valores médios da temperatura retal (°C) dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais	37

FIGURA 12	Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de cortisol (ng/mL) da primeira avaliação do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	38
FIGURA 13	Valores médios e erros padrão da concentração plasmática da progesterona (ng/mL) da primeira avaliação do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	39
FIGURA 14	Frequência de vocalizações no período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	40
FIGURA 15	Frequência de atitudes de deitar no período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	41
FIGURA 16	Frequência de exposições penianas e da glândula peniana no período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	42
FIGURA 17	Valores médios e erros padrão da frequência respiratória (movimentos por minuto) dos animais dos grupos Controle e Estresse da segunda avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais	44
FIGURA 18	Valores médios e erros padrão da frequência cardíaca (batimentos por minuto) dos animais dos grupos Controle e Estresse da segunda avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais	45
FIGURA 19	Valores médios e erros padrão da temperatura retal (°C) dos animais dos grupos Controle e Estresse da segunda avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais	46
FIGURA 20	Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de cortisol (ng/mL) da segunda avaliação do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	47

FIGURA 21	Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de cortisol (ng/mL) da primeira e segunda avaliações do período de contenção dos animais do grupo Controle durante as semanas experimentais	48
FIGURA 22	Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de cortisol (ng/mL) da primeira e segunda avaliações do período de contenção dos animais do grupo Estresse durante as semanas experimentais	48
FIGURA 23	Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) da segunda avaliação do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	49
FIGURA 24	Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) da primeira e segunda avaliações do período de contenção dos animais do grupo Controle durante as semanas experimentais	50
FIGURA 25	Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) da primeira e segunda avaliações do período de contenção dos animais do grupo Estresse durante as semanas experimentais	50
FIGURA 26	Frequência de abaixamento de cabeça no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	51
FIGURA 27	Frequência de lambidas no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	52
FIGURA 28	Frequência de cabeçadas no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	53
FIGURA 29	Frequência de coices no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	54
FIGURA 30	Frequência de defecações no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	55

FIGURA 31	Frequência de fugas no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	56
FIGURA 32	Frequência de micção no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	57
FIGURA 33	Frequência de salivação moderada no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	58
FIGURA 34	Frequência, somatória da frequência de salivação excessiva, proporção e proporção estimada da frequência de salivação excessiva dos animais dos grupos Controle e Estresse no período pós-contenção durante as semanas experimentais	59
FIGURA 35	Frequência de mugidos no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais	60

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

ACTH = hormônio adrenocorticotrófico

CRH = hormônio liberador de corticotrofina

EEJ = eletorejaculação

EP = erro padrão

IA = inseminação artificial

IM = intramuscular

mA = miliampêres

mL = mililitros

n = número de animais

ng = nanogramas

P₄ = progesterona

PRL = prolactina

pValor = valor da probabilidade

RM = massagem transretal

S = segundos

V = volts

VA = vagina artificial

x g = gravidade

W = watts

% = porcentagem

SUMÁRIO

RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVO.....	6
REVISÃO DE LITERATURA.....	8
1 Porque averiguar o bem-estar animal?.....	9
2 Como o estresse afeta o organismo?.....	9
3 Avaliação dos indicadores dos indicadores de bem-estar animal.....	12
3.1 Cortisol.....	13
3.2 Progesterona.....	14
3.3 Temperatura retal.....	14
3.4 Frequência cardíaca.....	15
3.5 Frequência respiratória.....	15
3.6 Indicadores comportamentais.....	15
4 Alterações dos indicadores de bem-estar animal em touros <i>Bos</i> <i>taurus taurus</i> submetidos à eletroejaculação.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
1 Local.....	20
2 Animais.....	20
2.1 Períodos e grupos experimentais.....	20
2.1.1 Período pré-contenção.....	20
2.1.2 Período de contenção.....	21
2.1.3 Período pós-contenção.....	22
2.2 Dosagem plasmática de cortisol e progesterona.....	22
2.3 Análise estatística.....	23
RESULTADOS.....	25
1 Período pré-contenção.....	26
1.1 Avaliação dos indicadores comportamentais.....	26
2 Período de contenção.....	34
2.1 Primeira avaliação dos indicadores fisiológicos.....	34
2.1.1 Indicadores não-endócrinos.....	34
2.1.2 Indicadores endócrinos.....	37

2.2 Indicadores comportamentais.....	39
2.3 Segunda avaliação dos indicadores fisiológicos.....	42
2.3.1 Indicadores não-endócrinos.....	42
2.3.2 Indicadores endócrinos.....	46
3 Período pós-contenção.....	51
3.1 Avaliação dos indicadores comportamentais.....	51
DISCUSSÃO.....	61
CONCLUSÃO.....	70
BIBLIOGRAFIA.....	73
ANEXOS.....	83

RESUMO

MARQUES FILHO, WOLFF CAMARGO. Avaliação do estresse em touros Nelore (*Bos taurus indicus*) submetidos à eletroejaculação. Botucatu, 2007. 85p. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da eletroejaculação (EEJ) sobre o estresse, 20 touros Nelore foram divididos em grupo Controle (n=10), deslocado semanalmente por nove semanas até o curral para avaliação em grupo dos indicadores comportamentais de bem-estar durante cinco minutos. Posteriormente, os animais foram contidos no tronco para avaliação dos indicadores fisiológicos de bem-estar (frequências respiratória e cardíaca e temperatura retal) e colheita de sangue, permanecendo sob contenção por cinco minutos, seguidos de nova avaliação dos indicadores fisiológicos e colheita de sangue para mensuração do cortisol e da progesterona plasmáticos. Depois da contenção os animais foram liberados em outro curral para avaliação individual dos indicadores comportamentais por cinco minutos. O grupo Estresse (n=10) foi submetido aos mesmos procedimentos, exceto que foi submetido semanalmente a aplicação de estímulos elétricos transretais pela EEJ durante os cinco minutos em que os animais permaneceram contidos. O grupo Controle foi submetido à EEJ somente na nona semana do experimento. Durante a observação dos períodos pré e pós-contenção, os animais do grupo Estresse apresentaram maior frequência de abaixamento de cabeça. Este grupo apresentou também maiores frequências respiratória e cardíaca e maiores concentrações plasmáticas de cortisol e de progesterona na segunda avaliação do período de contenção. A estimulação elétrica transretal alterou os indicadores comportamentais dos períodos pós e de contenção. As frequências respiratória e cardíaca e as concentrações plasmáticas de cortisol e de progesterona foram maiores na segunda avaliação do período de contenção no grupo Estresse, o que classifica a técnica da

eletroejaculação como um agente desencadeador de estresse em touros Nelore (*Bos taurus indicus*).

Palavras-chave: bem-estar animal, eletroejaculação, estresse, indicadores de bem-estar, touro.

ABSTRACT

MARQUES FILHO, WOLFF CAMARGO. Behavioural, physiological and endocrine effects of eletroejaculation in Nelore (*Bos taurus indicus*) bulls. Botucatu, 2007. 85p. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu.

The objective this work was to evaluate the stress effects to eletroejaculation (EEJ) in Nelore bulls. Twenty Nelore bulls were divided in two groups. The Control (n=10) was displaced weekly for nine weeks to a stable for evaluation behavior indicators for five minutes. The animals were restrained in a trunk for evaluation of physiological indicators (respiratory and heart rates, and rectal temperature) and blood sample collection for measurement of cortisol and progesterone plasmatic. After that they remained restrained for five minutes, followed by another evaluation of the physiological variables. They were released in a stable for five minutes for individual evaluation of the behavior indicators. The Stress group (n=10) was submitted to the same protocol except that the animals were submitted to a five minute session of transrectal eletric stimulation by EEJ device while they remained restrained. The animals of the Control group were also submitted to EEJ the nineth week of the study. Both before and after of the restrain period the animals of the Stress group showed greater frequency of lower head than those from Control group. The animals of the Stress group also had higher respiratory and heart rates and cortisol and progesterone plasma concetrations in the second evaluation of the restrain period than those from the Cotrol group. Eletric stimulation modified the welfare behavior indicators both after and during the restrain period. The respiratory and heart rates and cortisol and progesterone plasmatic concentrations of the second evaluation of the restrain period were higher in the Stress group. In conclusion, EEJ for five minutes should be considered as a stress procedure in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*).

Keywords: Bull, eletroejaculate, stress, welfare animal, welfare indicators.

Introdução

INTRODUÇÃO

A pecuária constitui-se numa das principais atividades da produção agropecuária brasileira, tendo cumprido papel fundamental no processo de ocupação do território nacional. Como atividade primária, destaca-se a pecuária bovina, que sempre predominou em relação às demais atividades mercantis (RAMOS, 2007). O PIB rural, medido dentro da porteira das fazendas, é menor que 9% do nacional. Contudo, tal riqueza primária contamina toda a economia, formando longas cadeias produtivas e gera o chamado PIB do agronegócio correspondente a 30% do PIB país (RAMOS, 2007).

Para alcançar tais resultados, a pecuária moderna faz uso da inseminação artificial (IA), uma das biotécnicas da reprodução mais importantes na atualidade, pois permite a fecundação da fêmea sem o contato direto com o macho por meio da colheita, manipulação e deposição do sêmen no aparelho reprodutivo, com instrumental e técnica apropriados (VANZIN, 2007).

Quando se avalia a evolução da produção e venda de sêmen bovino no Brasil após a década de setenta, verifica-se a crescente utilização da técnica de IA no país. A partir de 1985, a comercialização de sêmen bovino vem crescendo na ordem de 15% ao ano. Anualmente, o mercado nacional de sêmen vem movimentando cerca de R\$ 50 milhões de reais, com grande potencial de crescimento. São muitas as vantagens da técnica de IA, entre elas destacam-se o rápido melhoramento genético pela utilização de touros provados, controle das doenças da reprodução e utilização de touros que não teriam condições de adaptação ambiental (ASBIA, 2005; RURAL, 2007).

Estima-se um custo entre 20% e 30% menor para a inseminação artificial em relação à monta natural, para rebanhos de porte médio, portanto, os programas de IA podem significar a viabilização de alguns sistemas de produção agropecuários. O manejo geral de uma Central de Inseminação objetiva a produção do maior número de doses de sêmen no menor período de tempo possível, para maximizar os lucros e assim reduzir custos (RURAL, 2007).

Os problemas encontrados pelos médicos veterinários nos animais doadores de sêmen em centros de reprodução são: sobrepeso, bioclimatização inadequada, excesso ou falta de exercícios físicos, enfermidades e lesões adquiridas. Além desses, diretamente relacionados com o manejo e instalação inadequados (como: pisos irregulares, lisos ou duros para permanência e colheitas diárias), também contribuem para o aparecimento de problemas, as atitudes equivocadas dos operadores e acidentes com fêmeas em cio. Todos estes fatores refletem diretamente na queda da produção espermática, podendo também impossibilitar a obtenção do ejaculado e, portanto, provocar perdas econômicas significativas (RURAL, 2007).

Para realizar a colheita de sêmen podem ser utilizados diferentes métodos, entre eles, a eletroejaculação (EEJ), a vagina artificial (VA), a massagem transretal das glândulas sexuais acessórias (RM) e a aspiração do sêmen recém-depositado na vagina da fêmea (NUNES et al., 2001; NUNES et al., 2002; PALMER, 2005). Em função das vantagens e desvantagens das diversas metodologias, os dois primeiros métodos são os mais aplicáveis à realidade diária do manejo normal de centrais de inseminação (BARTH, 1997; MOSURE et al., 1998).

A colheita de sêmen pelo emprego da vagina artificial (VA), por mimetizar as condições fisiológicas da vagina é a que mais se assemelha à condição de monta natural (LISLE, 1995; HAFEZ & HAFEZ, 2000; PALMER, 2005), no entanto exige um condicionamento do touro a ser colhido e da vaca utilizada como manequim, caso não seja utilizado um manequim inanimado (BARTH, 1997).

A vagina artificial é constituída por tubo de borracha rígida (25 a 35 cm de comprimento por 6 a 8 cm de diâmetro) que possui válvula para preenchimento com água, mucosa de látex ou plástico resistente, cone coletor de látex e tubo coletor graduado (NUNES et al., 2001; NUNES et al., 2002). Segundo estes autores, para a colheita de sêmen, o animal é condicionado a montar em um manequim, vaca no cio ou não ou ainda em um outro macho. No momento do salto, o pênis é desviado para o interior da vagina artificial de modo que a ejaculação ocorra no seu interior. Para tanto, é necessário que o ambiente seja livre de fatores estressantes, como o citado para o método anterior de colheita e o piso deve ser antiderrapante. O método da vagina

artificial é o mais indicado para evitar alterações comportamentais nos animais, podendo ser realizadas até duas colheitas semanais sem causar alteração nos indicadores de bem-estar animal (NUNES et al., 2001; HELLEBREKERS, 2002; NUNES et al., 2002).

O eletroejaculador é um equipamento composto por uma central de comando (eletro-analógico, eletrônico-analógico ou eletrônico-digital), uma sonda retal com eletrodo (tamanho médio = 25 X 6 a 8 cm para bovinos) e uma fonte de energia (bateria ou cabo de força) (NUNES et al., 2001; NUNES et al., 2002).

O método de eletroejaculação compreende a introdução da sonda no reto do animal e aplicação de estímulos elétricos sobre o nervo pudendo e tronco vagossimpático. Os estímulos consistem na aplicação de corrente elétrica contínua de 12 volts que varia de 300 a 500 mA com potência de 4 watts (GUNN, 1936; DZIUK et al., 1954; NUNES et al., 2001; NUNES et al., 2002).

A técnica de colheita de sêmen consiste na aplicação de estímulos preparatórios, para provocar a excitação sexual, seguidos por estímulos desencadeadores da ejaculação (FURMAN et al., 1975; SALISBURY et al., 1978; LISLE, 1995; NUNES et al., 2001; NUNES et al., 2002).

Além do resultado já esperado no aparelho reprodutivo, a EEJ interferiu no comportamento geral de animais *Bos taurus taurus*, por causar desconforto, inquietação, vocalização (MUNIZ et al., 1997; LEBELT et al., 1996; SAUNDERS, 2000), elevação na frequência cardíaca (MOSURE et al., 1998), elevação do cortisol, da glicose e da progesterona plasmáticos (FALK et al., 2001; WELSH & JONHSON, 1981), parâmetros associados à aversão crescente a técnica pelos animais submetidos semanalmente às colheitas de sêmen (BARTH & BOWMAN, 1994). Este conjunto de reações permite classificar a EEJ como um estímulo estressor em bovinos de origem européia (BARTON & DWYER, 1997).

Durante a colheita, os principais cuidados são: contenção correta do animal, provocar a micção para a higiene prepucial, massagem pélvica das glândulas seminais e eliminação de fatores de estresse do ambiente como o barulho excessivo, agressões desnecessárias, utilização de instrumentos pontiagudos e choque (NUNES et al., 2001; NUNES et al., 2002).

Apesar da EEJ ter como vantagens a facilidade do manejo devido ao reduzido tempo de colheita e por permitir a colheita de animais arreados ao manejo de cabresto e manequim ou vaca em cio, a VA, quando comparada a EEJ, resulta em um ejaculado melhor qualidade, com maior concentração espermática e menor volume final, pois não causa a intensa estimulação elétrica das glândulas sexuais acessórias que ocorre durante a EEJ (HELLEBREKERS, 2002; BARTH, 2004).

A utilização rotineira da técnica da EEJ para a colheita de sêmen dos bovinos de origem indiana, comumente criados no Brasil, a qual possui desvantagens comparadas aos demais métodos já conhecidos em animais europeus, remetem a necessidade de conhecermos os efeitos do estresse imposto pela utilização da eletroejaculação semanal em touros Nelore (*Bos taurus indicus*).

Objetivo

OBJETIVO

Objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do estresse promovido pela estimulação elétrica transretal pela eletroejaculação em touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) sem nenhuma experiência prévia com o tratamento, durante nove semanas consecutivas, por meio da avaliação dos animais dos grupos Controle e Estresse e das alterações nos indicadores fisiológicos endócrinos (cortisol e progesterona plasmáticos) e não-endócrinos (frequência respiratória e cardíaca, e temperatura retal) imediatamente antes e após a EEJ, e nos indicadores comportamentais (frequência de abaixamento de cabeça, de lambidas, de cabeçadas, de coices, de defecações, de fugas, de micções, de mugidos, de atitudes de deitar, de vocalização, de exposição peniana, de salivação excessiva e moderada) de bem-estar animal nas fases anterior e posterior a contenção para aplicação da EEJ.

Revisão de literatura

REVISÃO DE LITERATURA

1 Porque averiguar o bem-estar animal?

O bem-estar animal baseia-se na definição da “senciência”, que é a capacidade dos animais apresentarem sentimentos, os quais são estados mentais, tais como as emoções e sensações físicas. Em função das semelhanças anátomo-fisiológicas, acredita-se que os seres humanos e os animais respondem de maneira semelhante aos estímulos impostos pelo meio ambiente. Sensações tais como fome, sede, dor e medo têm o mesmo impacto sobre os indicadores fisiológicos e comportamentais de estresse em humanos e animais (SINGER, 2004). De acordo com este autor, as semelhanças entre seres humanos e animais resultaram em um novo conceito: “o princípio da igualdade”, que postula a necessidade de semelhante consideração de interesses entre as espécies. Menciona também que, se o ser humano e o cão sentem dor, ambos têm interesse em eliminá-la. Como os interesses podem ser diferentes entre os animais e seres humanos, o princípio da igualdade não requer tratamento absolutamente igual para eles.

Ao desestabilizar o estado normal do organismo, o que ocorre ao interferirmos no bem-estar individual por exposição aos fatores de estresse, instala-se um quadro sistêmico, que provoca maior susceptibilidade à infecção. Essa deficiência do sistema humoral ocorre pela maior atividade adrenocortical (RADOSTITS, 2000). Por isso é importante o diagnóstico da situação vivenciada pelos animais impostos a um sistema intensivo de manejo, pois o conceito de bem-estar animal está intimamente relacionado à saúde do indivíduo, que é essencial para uma adequada produção e longevidade produtiva, que são à base de sustentação da economia agrícola (SANDOE, 1996).

2 Como o estresse afeta o organismo?

O estresse induz a mudança na secreção de hormônios, alterações metabólicas, na resposta imunológica e alterações no comportamento dos animais (RANDALL et al., 2000).

O hipotálamo, responsável pela liberação de hormônio liberador de corticotrofina (CRH), estimula a hipófise a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que por sua vez estimula a adrenal a produzir e secretar cortisol (MCDONALD, 1989a; RANDALL et al., 2000). Segundo estes autores, o cortisol mantém a gliconeogênese, lipólise, cetogênese, modula a função do sistema nervoso central, afeta o sistema imune, tem efeito antiinflamatório, além de afetar a renovação esquelética, a função muscular e a função renal. O glicocorticóide cortisol é essencial à vida por seus efeitos no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas. Ele possui uma meia-vida muito curta. Não existe armazenamento apreciável de cortisol na célula adrenocortical; conseqüentemente, a necessidade aguda de maior quantidade de cortisol circulante torna necessária à ativação rápida de toda sua seqüência sintética a partir do colesterol (MCDONALD, 1989c; RANDALL et al., 2000). Este hormônio interfere ainda direta ou indiretamente na contratilidade dos músculos estriados e lisos, reduz a síntese de colágeno, ocasionando o fenômeno do adelgaçamento da pele e parede capilar; eleva a pressão arterial, pela contratilidade dos músculos cardíacos e aumenta a espessura da parede dos vasos. Além de aumentar a filtração glomerular por meio da redução da resistência pré-glomerular e aumento do fluxo plasmático; modula a excitabilidade, comportamento e humor, reduz o sono, atenua a acuidade dos estímulos gustativos, auditivos, olfatórios e visuais uma vez que age sob o sistema límbico e hipocampo (MCDONALD, 1989a; RANDALL et al., 2000).

O cortisol interfere ainda na resposta ao estresse, devido à íntima relação anatômica entre medula supra-renal e córtex supra-renal, que reflete em uma inter-relação funcional fundamental entre o sistema nervoso adrenérgico e o eixo dos hormônios liberador de corticotropina (CRH), adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol (RANDALL et al., 2000).

O córtex e a medula supra-renais são os primeiros participantes na adaptação ao estresse, portanto, animais que respondem vigorosamente a situações de estresse com a secreção do CRH e, conseqüentemente, do cortisol, têm menor probabilidade de ativarem qualquer processo subjacente de doença auto-imune, mas podem disseminar uma infecção sistêmica, por estarem desprovidos de células de defesas suficientes. Porém o inverso é verdadeiro para os animais que são incapazes de elaborar, até mesmo, uma

resposta normal frente uma situação imposta de estresse (MCDONALD, 1989a; RANDALL et al., 2000). Há relatos de diminuição na contagem no número de neutrófilos, basófilos, linfócitos e eosinófilos em bezerros mantidos confinados (WILSON et al., 1999).

Outro hormônio que se altera na circulação sanguínea de animais submetidos a estímulos estressantes é a prolactina (PRL), um hormônio polipeptídico secretado em forma de pulsos pela adeno-hipófise com meia-vida de quinze minutos, que participa na estimulação do desenvolvimento das mamas, na produção do leite e apresenta propriedades biológicas semelhantes ao hormônio do crescimento. Sua secreção é estimulada pela presença de hormônio liberador de corticotropina (CRH) e pelo hormônio tireotrófico (TRH), inibida por hormônios inibitórios (PIH); provavelmente as catecolaminas, a dopamina e o estradiol (E_2) desempenham esse efeito (RANDALL et al., 2000).

Além da função de manter a lactação, a PRL possui propriedades luteotróficas, ainda que bem menores quando comparadas as do hormônio luteinizante (MCDONALD, 1989b; HAFEZ & HAFEZ, 2000), e estimulam o desenvolvimento de receptores para LH nas células de Leydig (MCDONALD, 1989b). Além disso, exerce influência direta e indireta sobre as funções reprodutiva e imune (MCDONALD, 1989b; RANDALL et al., 2000).

A progesterona (P_4) é um esteróide produzido pelo corpo lúteo (CL) a partir de um estímulo hormonal provindo do eixo hipotálamo-hipofisário: o hormônio luteinizante (LH). Em altas concentrações, a progesterona regula a função deste eixo, por meio do mecanismo de retroalimentação negativa, inibindo a secreção do pico ovulatório de LH (RANDALL et al., 2000).

A progesterona, produzida pelo CL em vacas, cabras e cadelas e pela placenta e CL em ovelhas, é responsável pela manutenção da gestação (HAFEZ & HAFEZ, 2000; RANDALL et al., 2000). Além do CL, a glândula adrenal também produz P_4 quando estimulada pelo ACTH. Essa estimulação faz com que a P_4 se eleve no plasma imediatamente após situações de estresse (HENNESSY & WILLIANSOON, 1983; TSUMA et al., 1996; TSUMA et al., 1998; RUIS et al., 2001; MAZIERO et al., 2006). A progesterona elevada inibe a secreção de GnRH, o que reduz a secreção de LH e FSH pela hipófise e esteróides sexuais e inibina pelas gônadas (RANDALL et al., 2000).

O estresse é acompanhado pelo aumento da atividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HPA), que resulta na secreção elevada de cortisol. Nessa situação, ocorre a redução da função reprodutiva, fenômeno explicado pela necessidade de preservar o organismo e as funções vitais. Como um dos possíveis mecanismos de influência do estresse sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG), temos as relações que existem entre CRH, ACTH, cortisol, prolactina e progesterona (SELYE, 1939).

CRH, ACTH, β -endorfina e adrenocorticosteróides modulam o efeito do estresse sobre a função reprodutiva em ratos, diretamente no cérebro, inibindo a secreção de GnRH. Na hipófise esses hormônios diminuem a liberação de LH, em resposta ao GnRH e, finalmente nas gônadas, alteram o efeito estimulatório das gonadotrofinas sobre a produção de hormônios sexuais (MACLUSKY et al., 1988; RIVIER & RIVEST, 1991). Em fêmeas bovinas, o transporte rodoviário ou aplicação de insulina reduzem a frequência e a amplitude da liberação de GnRH e LH (DOBSON & SMITH, 2000).

Dependendo da fase do processo reprodutivo, a prolactina também exerce funções estimulantes e inibitórias sobre a reprodução. O excesso deste hormônio bloqueia a síntese e liberação de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), o que impede a ovulação nas fêmeas e a espermatogênese nos machos, associada ou não a redução da libido dos machos e a estimulação do comportamento paterno-materno dos animais com relação a recém-nascidos (RANDALL et al., 2000).

3 Avaliação dos indicadores de bem-estar animal

O conceito mais aceito pela comunidade científica e órgãos avaliadores do bem-estar animal é o das cinco liberdades. Este conceito postula que, para um animal se encontrar em um estado de bem-estar pleno, ele deve apresentar as seguintes liberdades (FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL, 2007):

1. Liberdade fisiológica (ausência de fome e sede);
2. Liberdade ambiental (livre de desconforto);
3. Liberdade sanitária (ausência de doenças e fraturas);

4. Liberdade comportamental (possibilidade de exprimir comportamentos normais);
5. Liberdade psicológica (ausência de medo e ansiedade);

De forma a possibilitar uma avaliação mais objetiva das cinco liberdades, vêm sendo definidas variáveis capazes de servirem como indicadores fisiológicos e comportamentais de bem-estar animal. Os principais indicadores fisiológicos são: níveis plasmáticos de cortisol, prolactina e progesterona, temperatura corporal, frequências cardíaca e respiratória. Os principais indicadores comportamentais em bovinos são: número de cabeçadas, defecações, micções, montas, vocalizações, lambidas, ruminação, fugas, lutas, exposições penianas e atitudes de deitar, cheirar e abaixar a cabeça (KENT & EWBANK, 1986; DOBSON & SMITH, 2000; DOBSON et al., 2001; FALK et al., 2001; HELLEBREKERS, 2002; PALMER, 2005).

3.1 Cortisol

O cortisol eleva-se rapidamente, a partir dos níveis basais em *Bos taurus taurus* compreendidos entre 5/10 (NAKAO & GRUNERT, 1990) e 15 ng/mL (GRANDIN, 1997), após aplicação de estímulos estressantes e caracteriza-se como um excelente indicador de estresse agudo (RANDALL et al., 2000).

Suas ações metabólicas podem ser detectadas dentro de trinta minutos e inclui a inibição da liberação de ACTH. No entanto, algumas expressões desses efeitos podem levar horas, como o caso da elevação da glicose (MCDONALD, 1989c; RANDALL et al., 2000). A resposta dos glicocorticóides é proporcional à gravidade do estresse (MCDONALD, 1989c; CUNNINGHAM, 1997).

Devido as suas características lipossolúveis, o cortisol distribui-se por todo corpo e pode ser mensurado a partir de amostras de sangue e saliva. Os métodos mais empregados para a mensuração são o radioimunoensaio (RIA) (BERNE et al., 2000) e o ensaio imunoenzimático (EIA) (CHACÓN PÉREZ et al., 2004).

Diversos estímulos podem desencadear o aumento dos níveis plasmáticos do cortisol produzido pela adrenal, entre eles, choque elétrico,

manejo estressante, procedimentos cirúrgicos e de transporte (ETSON et al., 2004). Alguns métodos clássicos para o estudo do estresse nos bovinos consistem em submetê-los a transporte em caminhões, reagrupá-los em novos currais e lotes e mensurar a elevação dos níveis séricos de cortisol (KENNY & TARRANT, 1987).

3.2 Progesterona

A concentração plasmática média basal de progesterona em vacas *Bos taurus taurus*, sem a presença de corpo lúteo e ovariectomizadas, é igual a 0,5 ng/mL, alcançando valores acima de 1 ng/mL com a formação do corpo lúteo, e quando é produzida por fonte extra-gonadal em condições de estresse, pela adrenal (YOSHIDA et al., 2005). Segundo diversos autores, este hormônio também pode ser considerado um indicador fisiológico de bem-estar animal, pois a semelhança do cortisol e da prolactina, ela também se eleva significativamente após um estímulo estressor em machos e fêmeas bovinos. No caso da progesterona o aumento já é percebido cinco minutos após a aplicação do estímulo estressor em vacas ovariectomizadas ou não, machos (NANDA et al., 1990; HEIN & ALLRICH, 1992; COOPER et al., 1995; BARBERA et al., 1999; TASSONE et al., 1999; ETSON et al., 2004; HOLLENSTEIN et al. 2005; YOSHIDA & NAKAO, 2005; MAZIERO et al., 2006), e em ratos machos (DEIS et al., 1989; DUNCAN et al., 2005).

3.3 Temperatura retal

A temperatura retal dos bovinos fisiologicamente varia entre 37,5 e 39,5⁰C, também pode ser utilizada como indicador de bem-estar animal (MCDONALD, 1989b; RADOSTITS, 2000).

Os animais mantêm sua temperatura interna relativamente constante durante variações extremas de temperatura ambiental (homeotermia). A produção de calor ocorre como resultado da atividade metabólica, digestão do alimento, movimentos musculares e manutenção do tônus muscular

(RADOSTITS, 2000). Segundo este autor, o mecanismo pelo qual a temperatura se eleva em situações de estresse relaciona-se ao efeito calorígeno da adrenalina e noradrenalina, liberadas em maior quantidade na circulação sanguínea.

3.4 Frequência cardíaca

O pulso cardíaco é o número de batimentos do coração por minuto, fisiologicamente compreendido entre 50 e 70 pulsos por minuto nos bovinos (RADOSTITS, 2000). A ausculta cardíaca é um meio semiológico de grande importância na avaliação clínica do animal. Em situações de estresse agudo, os batimentos cardíacos se mostram em níveis superiores do normal, o que o classifica como um indicador de estresse (KENNY & TARRANT, 1987; MOSURE et al., 1998; RADOSTITS, 2000; PALMER et al., 2005). Em estudos realizados por Kenny & Tarrant (1987), a frequência cardíaca elevou-se quando um grupo de touros foi locado em um caminhão estático ou em movimento, ou deslocado para novos currais e novos lotes.

3.5 Frequência respiratória

A frequência respiratória corresponde ao número de movimentos respiratórios por minuto e seus valores fisiológicos variam entre 25 e 35 movimentos por minuto. Esta variável é um importante fator para avaliação do estado clínico agudo e crônico dos animais e sofre variações imediatas de acordo com a resposta física do organismo a mudanças climáticas, metabólicas e estresse (FURMAN et al., 1975; RADOSTITS, 2000).

3.6 Indicadores Comportamentais

O comportamento animal está dividido em aspectos de interação social (coices, cabeçadas, tentativa de monta, montas propriamente ditas, mugidos ou vocalização, abaixar a cabeça e fugas), eliminação (defecação e micção) e exploração (lambidas e ato de cheirar). A modificação na frequência de expressão desses comportamentos pode sinalizar o comprometimento do bem-

estar. Geralmente, quanto mais comprometida estiver a expressão do comportamento, maior é a gravidade do estresse (KENT & EWBANK, 1986; KENNY & TARRANT, 1987).

A ocorrência de cabeçadas, atividade sexual (monta de um animal sobre o outro) e atitudes exploratórias elevadas foram observadas ao realocar os animais em outro curral ou caminhão de transporte (KENNY & TARRANT, 1987). De acordo com estes autores, a locação de touros em um caminhão estacionado provocou aumento na frequência de coices, ato de cheirar e lamber e micção. Ao movimentar o caminhão, elevou-se o número de atitudes relacionadas à orientação espacial, como movimentos de abaixamento e lateralização da cabeça, além do comportamento exploratório, micção e coices. Ainda no caminhão, porém reagrupando os animais em novos lotes, observou-se o aumento da atividade sexual, coices, cabeçadas, micção e da atitude exploratória.

Os animais que passaram maior tempo confinados em gaiolas permaneceram mais tempo deitados em relação aos animais com maior possibilidade de movimentação (WILSON et al., 1999).

Os animais transportados tendem a se deitar e o número de animais deitados aumenta com o passar das horas de transporte. Por outro lado o número de animais ruminando diminui como o aumento do tempo de transporte (KENT & EWBANK, 1986).

Quando um grupo de bovinos foi submetido a um novo ambiente, observaram um aumento em todos os parâmetros comportamentais, com exceção da frequência de defecações (KENNY & TARRANT, 1987).

4 Alterações dos indicadores de bem-estar animal em touros *Bos taurus taurus* submetidos a eletroejaculação

Touros submetidos à colheita de sêmen por eletroejaculação têm seus indicadores fisiológicos e comportamentais de bem-estar alterados em resposta aos estímulos elétricos aplicados pela EEJ (PALMER, 2005).

Avaliados durante e após a colheita de sêmen pelo método da EEJ, os indicadores comportamentais de desconforto aos estímulos elétricos mais frequentes foram o de tentativa de fuga da contenção do brete, intensas

contrações musculares e vocalizações (SAUNDERS, 2000; WATTS & STOOKEY, 2000; FALK et al., 2001; ETSON et al., 2004).

A alteração da frequência cardíaca também foi observada em touros submetidos à EEJ e esse aumento tendeu a ser significativamente mais pronunciado quando a frequência cardíaca de animais submetidos à EEJ foi comparada a de animais que sofreram massagem transretal para a colheita de sêmen (FURMAN et al., 1975; MOSURE et al., 1998).

Quando analisados os indicadores endócrinos de bem-estar, também ficam evidentes as consequências da estimulação elétrica da EEJ sobre os animais. Os níveis plasmáticos de cortisol, principal indicador endócrino de estresse, assim como o de PRL e de P_4 , elevaram-se em touros submetidos a EEJ (FALK et al., 2001; PALMER, 2005).

A caracterização dos estímulos elétricos da EEJ como o fator desencadeador de estresse, vem estimulando a realização de pesquisas que visam minimizar os efeitos maléficos da EEJ sobre os animais (MOSURE et al., 1998; FALK et al., 2001; ETSON et al., 2004; PALMER, 2005; PALMER et al., 2005).

A dor parece ser o principal fator desencadeador de alterações indicadoras de estresse nos animais submetidos a EEJ. Para estudar essa hipótese, vários estudos vêm sendo realizados para verificar os efeitos da xilazina, administrada por via endovenosa (0,033 mg/kg) ou epidural (0,007 mg/kg diluídos em 7 mL de solução salina), ou de anestésicos locais, por via epidural (5 mL de lidocaína 2%) ou transretal (30 mL de lidocaína 2% com epinefrina). Os melhores resultados obtidos com os protocolos que envolviam o uso da xilazina ou lidocaína administrados por via epidural, refletiram-se na forma de uma menor elevação da frequência cardíaca, de emissão de mugido e de vocalizações (MOSURE et al., 1998; WATTS & STOOKEY, 2000; FALK et al., 2001) e de menor elevação dos níveis séricos de P_4 e de cortisol nos touros durante e após sofrerem a colheita de sêmen pela eletroejaculação (FALK et al., 2001; ETSON et al., 2004). Os resultados desses estudos, portanto, confirmaram a hipótese da dor ser o principal componente desencadeador do estresse nos animais submetidos à EEJ, e geraram protocolos que podem ser empregados para reduzir esse fator indesejável.

Material e método

MATERIAL E MÉTODOS

1 Local

O experimento foi realizado na Fazenda Experimental São Manoel da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP/Botucatu e no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária (DRARV) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP, Campus de Botucatu.

2 Animais

Foram utilizados 20 touros Nelore P.O, adultos, com média de idade de 30 meses e escore corporal igual ou superior a 3 (escala de 0 a 5) (Wildman et al., 1982), mantidos na Fazenda Experimental São Manoel, município de São Manoel, em manejo de pastagem, suplementação mineral e água *ad libitum*.

2.1 Períodos e grupos experimentais

Os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos, Controle e Estresse, com dez animais cada. Os grupos, separadamente, foram conduzidos até o curral e submetidos semanalmente, por nove semanas consecutivas, às avaliações e procedimentos descritos a seguir.

2.1.1 Período pré-contenção

Os animais do grupo Controle foram conduzidos até o curral de espera, onde permaneceram por cinco minutos, chamado período pré-contenção, para avaliação, em grupo, da frequência de expressão individual dos seguintes indicadores comportamentais de bem-estar animal:

- Abaixamento de cabeça: movimento descendente da cabeça e pescoço abaixo da linha do dorso na tentativa de intimidação ou de submissão;

- Atitudes de deitar: movimento de flexão do corpo para baixo, em posição esternal ou lateral.
- Cabeçadas: ato repentino realizado por meio de movimento com a cabeça em direção ou não a outro animal;
- Coices: movimento realizado com um ou dois membros traseiros após firmar os membros dianteiros, em direção a um outro animal ou sem um alvo específico;
- Defecações: eliminação de fezes;
- Exposição peniana: ato de expor a glândula ou o pênis;
- Fugas: movimento ou ação como recurso para subtrair-se de uma dificuldade em razão de opressão ou ameaça;
- Lambidas: movimento realizado com a língua expondo-a fora da boca em direção ao próprio corpo, objeto ou outro animal;
- Micções: emissão natural da urina;
- Mugidos: emissão sonora característica de bovinos, com finalidade de comunicação e interação;
- Salivação: extravazamento de saliva pela abertura oral. De acordo com o volume o extravazamento foi classificado em excessivo (sialorréia) ou moderado (gotas).
- Vocalização: emissão de som não específico, sem finalidade de interação;

2.1.2 Período de contenção

Após a avaliação inicial, os animais foram contidos individualmente no brete para a primeira avaliação dos indicadores fisiológicos de bem-estar. Durante este período, foram mensuradas nesta ordem, as frequências respiratória (número de movimentos respiratórios por minuto) e cardíaca (número de movimentos cardíacos por minuto), aferida a temperatura corpórea retal, e colhida amostra de sangue por punção do plexo sanguíneo caudal.

A seguir, os animais foram mantidos sob contenção por cinco minutos sem que nenhum procedimento fosse realizado. Apenas na nona semana do experimento, este período de contenção foi utilizado para submeter os animais

deste grupo à estimulação elétrica transretal pela técnica de eletroejaculação, que foi padronizada de modo que fossem aplicados sucessivamente estímulos elétricos de corrente contínua de 12 volts, 300 a 500 mA e potência de quatro watts durante três segundos, intercalados por três segundos de repouso.

Durante o período de contenção foram avaliados os seguintes indicadores comportamentais de bem-estar animal: atitudes de deitar, exposição peniana e vocalização.

Após este período, uma segunda avaliação dos indicadores fisiológicos de bem-estar animal e colheita de sangue foi realizada de maneira idêntica à anterior.

2.1.3 Período pós-contenção

Após o período de contenção, os animais foram liberados em outro curral para avaliação individual dos indicadores comportamentais de bem-estar por cinco minutos. Os indicadores avaliados foram idênticos aos do período pré-contenção.

Os animais do grupo Estresse foram submetidos aos mesmos procedimentos que os do grupo Controle, exceto que durante o período de contenção, em todas as nove avaliações semanais, foi realizada a estimulação elétrica transretal de forma idêntica a realizada na nona semana nos animais do grupo Controle.

A sequência completa dos procedimentos experimentais estão apresentadas nos etogramas 1 e 2 (anexo 1 e 2).

2.2 Dosagem plasmática de cortisol e progesterona

As amostras de sangue, acondicionadas em tubo de ensaio de dez mL contendo anti-coagulante (heparina) e refrigeradas por duas a quatro horas em temperatura de 5°C, e posteriormente centrifugadas a 1710 x g por 15 minutos para a obtenção do plasma, que foi armazenado em microtubos de 1,5 mL (ependorf®) em temperatura de -20°C.

As amostras escolhidas aleatoriamente de 3 touros do grupo Controle e de 4 touros do grupo Estresse e de 5 touros do grupo Controle e de 6 touros do

grupo Estresse foram utilizadas para a dosagem plasmática das concentrações de cortisol e de progesterona, respectivamente. As amostras obtidas foram avaliadas em um só ensaio para cada hormônio, com coeficiente de variação intra-ensaio de 4,36% para o cortisol e de 5,42% para progesterona.

As amostras de plasma foram avaliadas utilizando kits comerciais (DPC MedLab) com leitura por radioimunoensaio dos níveis de cortisol e de progesterona, seguindo-se as instruções do fabricante, no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu.

2.3 Análise estatística

Os dados comportamentais observados no período pré-contenção e pós-contenção foram organizados na forma de frequência de expressão do comportamento. A comparação entre os grupos, durante as nove semanas do experimento, foi realizada pelo Teste Exato, considerando-se a hipótese que o grupo Estresse apresentava maiores frequências. As frequências semanais foram somadas e, estas somatórias de cada grupo, foram também comparadas pelo Teste Exato considerando-se a mesma hipótese (KENNEY & KEEPING, 1962; MOOD et al., 1974; EDWARDS, 1976).

O estudo do efeito das semanas, grupos e da interação entre grupos e semanas, foi realizado por Regressão Logística (VITTINGHOFF et al., 2005).

Para as variáveis fisiológicas observados durante o período de contenção foram empregados, respectivamente, a média e o erro padrão como medidas de tendência central e variabilidade dos dados (MOOD et al., 1974).

A comparação entre as médias semanais dos grupos experimentais, entre as médias da primeira e segunda avaliações e entre as médias gerais de cada grupo experimental, considerando todos os valores observados durante o experimento, foi realizada por meio do teste *t-Student* (MOOD et al., 1974). O efeito de semana, de grupo e da interação entre semana e grupo, foi estudado por meio de Regressão Linear (CHARNET et al., 1999).

A proporção entre as variáveis dos animais dos grupos Estresse e Controle foi obtida pela divisão entre os valores das variáveis do grupo Estresse/Controle. A proporção estimada também entre os grupos foi obtida

pela fórmula resultante das regressões Logística e Linear, supondo o resultado da proporção esperado para um experimento semelhante com maior número de animais.

As inter-relações entre as concentrações plasmáticas de cortisol e de progesterona foram determinadas pelo cálculo de correlação empregando-se o método de Pearson (Zar, 1984).

O nível de significância para todos os testes realizado foi de 95% ($p \leq 0,05$).

Resultados

RESULTADOS

1 Período pré-contenção

1.1 Avaliação dos indicadores comportamentais

A frequência de abaixamento de cabeça do grupo Estresse foi maior que no grupo Controle na primeira, terceira, quarta e oitava semanas, e quando foram comparadas as somatórias das frequências semanais dos grupos ($p \leq 0,02$) (tabela e figura 1).

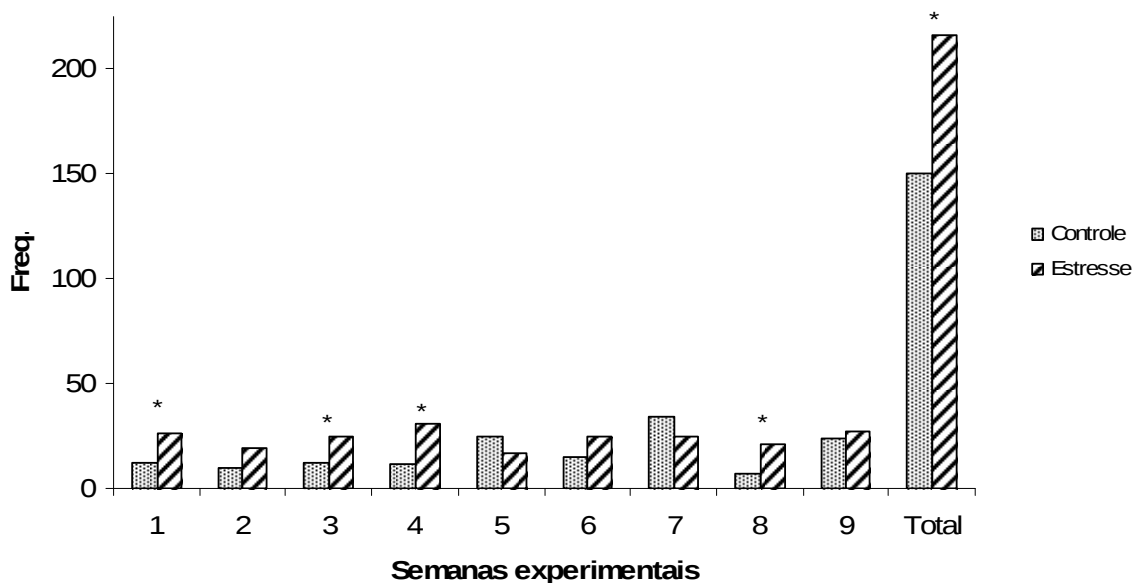
Esta variável foi influenciada pela interação entre semana e grupo experimental ($p \leq 0,05$), tendo sido observado o aumento e a diminuição da frequência de abaixamento de cabeça, respectivamente, nos animais do grupo Controle e Estresse, ao longo das semanas. Este efeito pode ser observado pela evolução da proporção da frequência semanal entre os grupos Estresse e Controle. Não foram detectadas influências significativas das semanas e grupos isoladamente sobre esta variável ($p > 0,05$) (tabela 1).

Tabela 1. Frequência de abaixamento de cabeça, proporção e proporção estimada da frequência de abaixamento de cabeça dos animais dos grupos Controle e Estresse no período pré-contenção durante as semanas experimentais

Semanas	Controle (C)	Estresse (E)	Proporção E/C	Prop. E/C Estimada
1	12 ^a	26 ^b	2,16	2,09
2	10 ^a	19 ^a	1,90	1,92
3	12 ^a	25 ^b	2,08	1,76
4	11 ^a	31 ^b	2,81	1,61
5	25 ^a	17 ^a	0,68	1,47
6	15 ^a	25 ^a	1,66	1,35
7	34 ^a	25 ^a	0,73	1,24
8	7 ^a	21 ^b	3,00	1,13
9	24 ^a	27 ^a	1,12	1,04
Total	150 ^a	216 ^b	1,44	1,16

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,02$)

Figura 1. Frequência de abaixamento de cabeça dos animais dos grupos Controle e Estresse no período pré-contenção durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,02$)

A frequência de lambidas não diferiu entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), exceto na segunda semana na qual foi observada maior frequência de lambidas ($p \leq 0,01$) nos animais do grupo Estresse (tabela e figura 2).

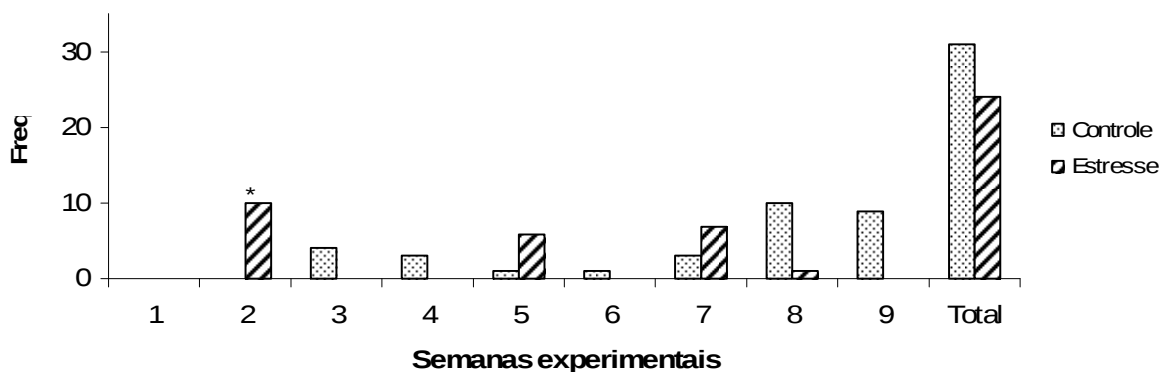
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 2. Frequência de lambidas no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	0 ^a	0 ^a
2	0 ^a	10 ^b
3	4 ^a	0 ^a
4	3 ^a	0 ^a
5	1 ^a	6 ^a
6	1 ^a	0 ^a
7	3 ^a	7 ^a
8	10 ^a	1 ^a
9	9 ^a	0 ^a
Total	31 ^a	24 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,01$)

Figura 2. Frequência de lambidas no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,01$)

A frequência de cabeçadas não diferiu entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), exceto na nona semana na qual foi observada maior frequência ($p \leq 0,01$) nos animais do grupo Estresse (tabela e figura 3).

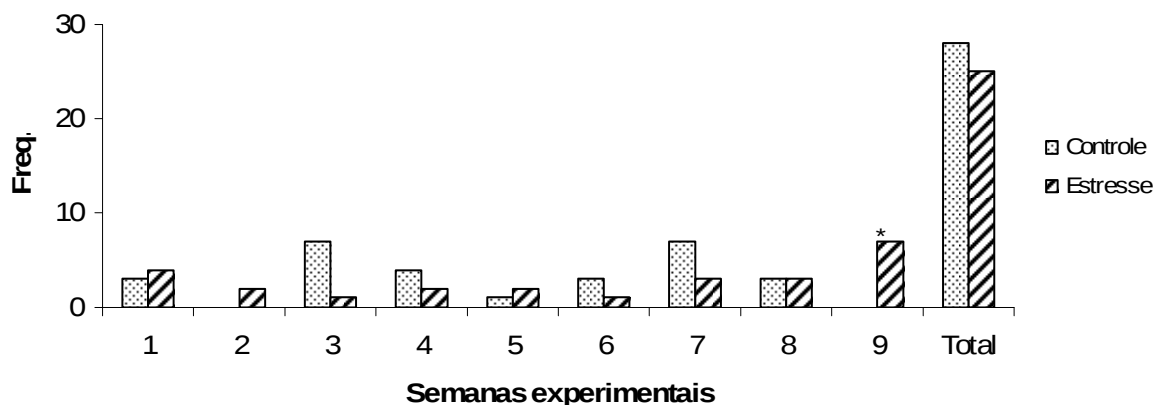
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 3. Frequência de cabeçadas no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	3 ^a	4 ^a
2	0 ^a	2 ^a
3	7 ^a	1 ^a
4	4 ^a	2 ^a
5	1 ^a	2 ^a
6	3 ^a	1 ^a
7	7 ^a	3 ^a
8	3 ^a	3 ^a
9	0 ^a	7 ^b
Total	28 ^a	25 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,01$)

Figura 3. Frequência de cabeçadas no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,01$)

A frequência de coices no período pré-contenção não diferiu entre os grupos experimentais durante as semanas ($p > 0,05$) (tabela e figura 4).

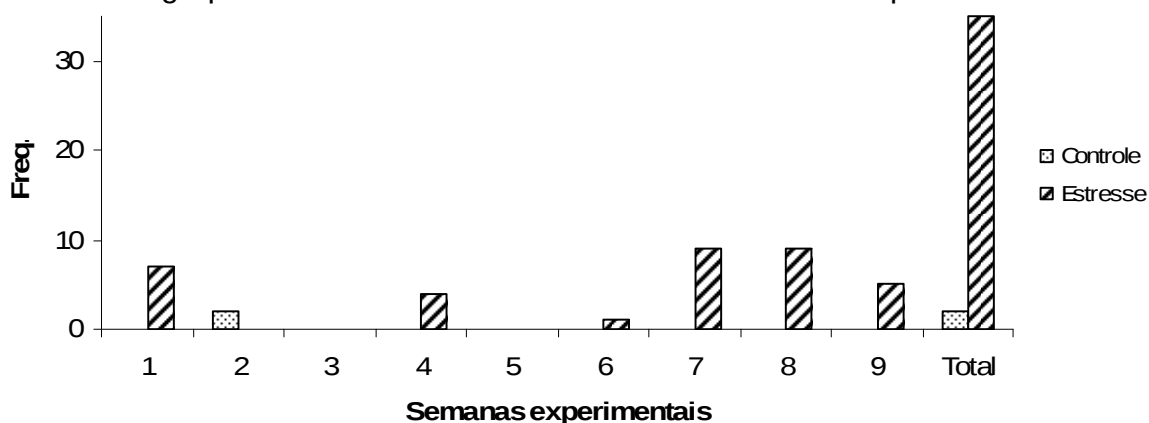
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 4. Frequência de coices no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	0 ^a	7 ^a
2	2 ^a	0 ^a
3	0 ^a	0 ^a
4	0 ^a	4 ^a
5	0 ^a	0 ^a
6	0 ^a	1 ^a
7	0 ^a	9 ^a
8	0 ^a	9 ^a
9	0 ^a	5 ^a
Total	2 ^a	35 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 4. Frequência de coices no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A frequência de defecações no período pré-contenção não diferiu entre os grupos experimentais durante as semanas ($p > 0,05$) (tabela e figura 5).

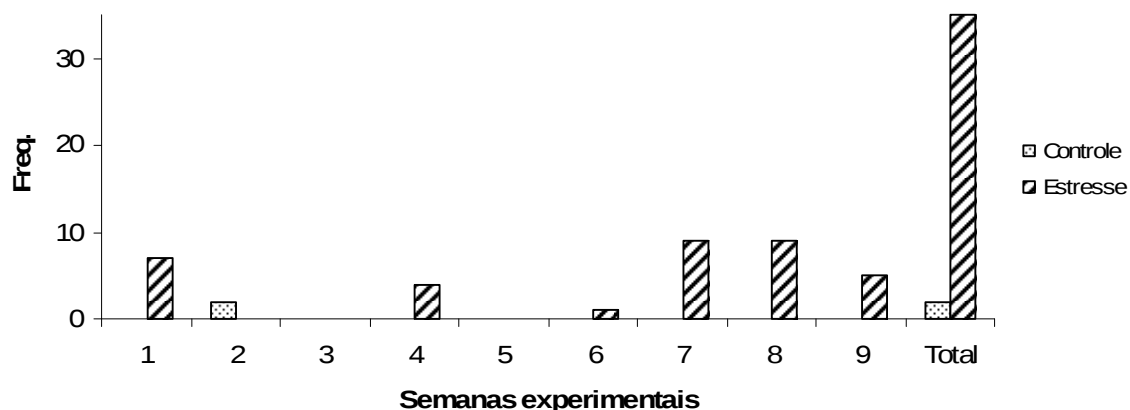
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 5. Frequência de defecações no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	3 ^a	0 ^a
2	5 ^a	1 ^a
3	0 ^a	3 ^a
4	1 ^a	2 ^a
5	6 ^a	1 ^a
6	5 ^a	6 ^a
7	3 ^a	6 ^a
8	4 ^a	4 ^a
9	2 ^a	2 ^a
Total	29 ^a	25 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 5. Frequência de defecações no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A frequência de fugas no período pré-contenção não diferiu entre os grupos experimentais durante as semanas ($p > 0,05$) (tabela e figura 6).

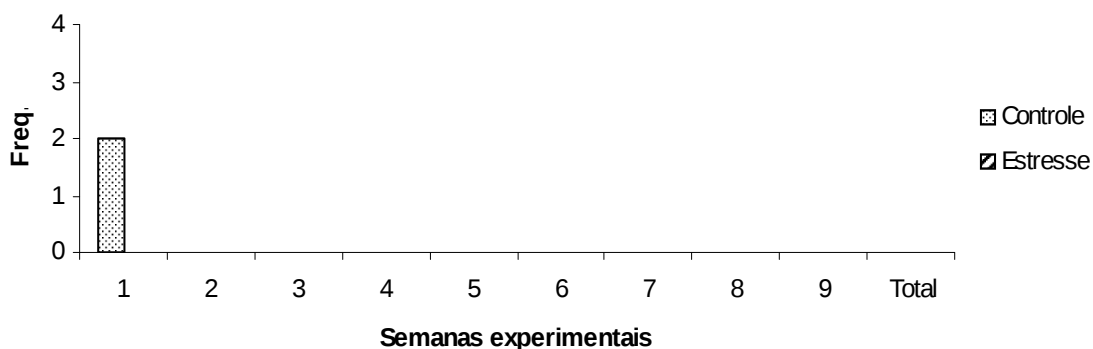
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 6. Frequência de fugas no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	2 ^a	0 ^a
2	0 ^a	0 ^a
3	0 ^a	0 ^a
4	0 ^a	0 ^a
5	0 ^a	0 ^a
6	0 ^a	0 ^a
7	0 ^a	0 ^a
8	0 ^a	0 ^a
9	0 ^a	0 ^a
Total	0 ^a	0 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 6. Frequência de fugas no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A frequência de micções no período pré-contenção não diferiu entre os grupos experimentais durante as semanas ($p > 0,05$) (tabela e figura 7).

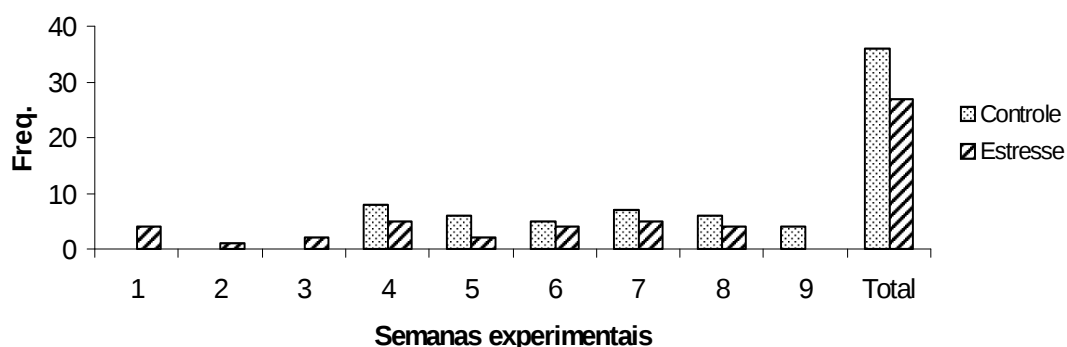
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 7. Frequência de micções no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	0 ^a	4 ^a
2	0 ^a	1 ^a
3	0 ^a	2 ^a
4	8 ^a	5 ^a
5	6 ^a	2 ^a
6	5 ^a	4 ^a
7	7 ^a	5 ^a
8	6 ^a	4 ^a
9	4 ^a	0 ^a
Total	36 ^a	27 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 7. Frequência de micções no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A frequência de mugidos no período pré-contenção não diferiu entre os grupos experimentais durante as semanas ($p > 0,05$) (tabela e figura 8).

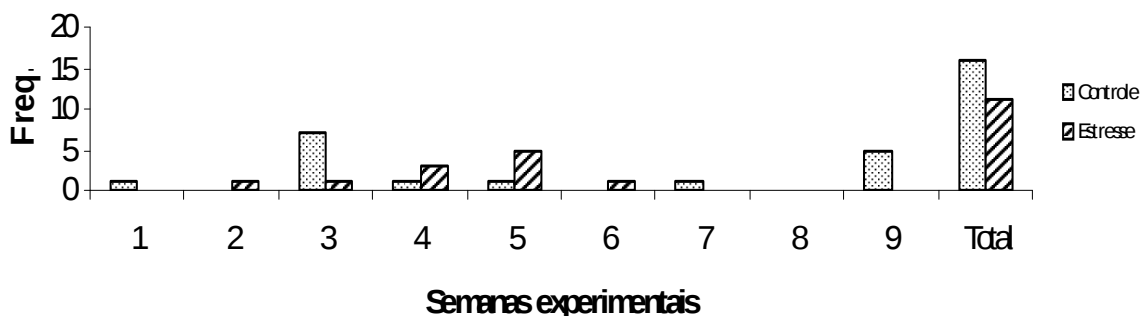
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 8. Frequência de mugidos no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	1 ^a	0 ^a
2	0 ^a	1 ^a
3	7 ^a	1 ^a
4	1 ^a	3 ^a
5	1 ^a	5 ^a
6	0 ^a	1 ^a
7	1 ^a	0 ^a
8	0 ^a	0 ^a
9	5 ^a	0 ^a
Total	16 ^a	11 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 8. Frequência de mugidos no período pré-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

2 Período de contenção

2.1 Primeira avaliação dos indicadores fisiológicos

2.1.1 indicadores não endócrinos

A frequência respiratória média da primeira avaliação do período de contenção não diferiu entre os grupos nas semanas experimentais ($p > 0,05$) (tabela e figura 9).

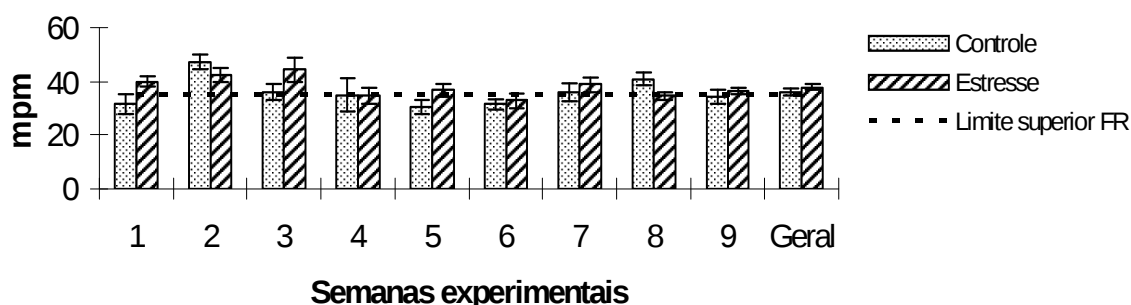
Contudo, esta variável modificou-se ($p \leq 0,05$), tendo sido observada a sua diminuição nos animais dos grupos Controle e Estresse ao longo das semanas experimentais. Este efeito pode ser observado pela evolução da frequência respiratória estimada e da proporção estimada das frequências respiratórias entre os grupos Estresse e Controle. Não foram detectadas influências significativas do grupo e da interação entre a semana e o grupo experimental ($p > 0,05$) (tabela 9).

Tabela 9. Valores médios e erros padrão da frequência respiratória (movimentos por minuto), frequência respiratória estimada, proporção e proporção estimada da frequência respiratória dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais

Semanas	Controle (C)	Estresse (E)	Cont. Est.	Est. Est.	Prop. E/C	Prop. E/C Est.
1	31,60 ± 3,63 ^a	40,00 ± 1,94 ^a	45,91	41,27	1,27	0,90
2	47,20 ± 2,78 ^a	42,40 ± 2,61 ^a	44,02	40,42	0,90	0,92
3	36,00 ± 2,92 ^a	44,40 ± 4,44 ^a	42,13	39,57	1,23	0,94
4	34,80 ± 6,26 ^a	34,80 ± 2,92 ^a	40,24	38,72	1,00	0,96
5	30,40 ± 2,69 ^a	36,80 ± 2,37 ^a	38,35	37,87	1,21	0,99
6	31,60 ± 1,92 ^a	32,80 ± 2,61 ^a	36,46	37,02	1,04	1,02
7	36,00 ± 3,26 ^a	38,80 ± 2,8 ^a	34,57	36,17	1,08	1,05
8	40,89 ± 2,21 ^a	34,67 ± 1,49 ^a	32,68	35,32	0,85	1,08
9	34,22 ± 2,53 ^a	36,44 ± 1,23 ^a	30,79	34,47	1,06	1,12
Geral	35,85 ± 1,27 ^a	37,90 ± 0,95 ^a	47,80	42,12	0,95	0,88

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 9. Valores médios e erros padrão da frequência respiratória (movimentos por minuto) dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A frequência cardíaca média da primeira avaliação do período de contenção não diferiu entre os grupos nas semanas experimentais ($p > 0,05$) (tabela e figura 10).

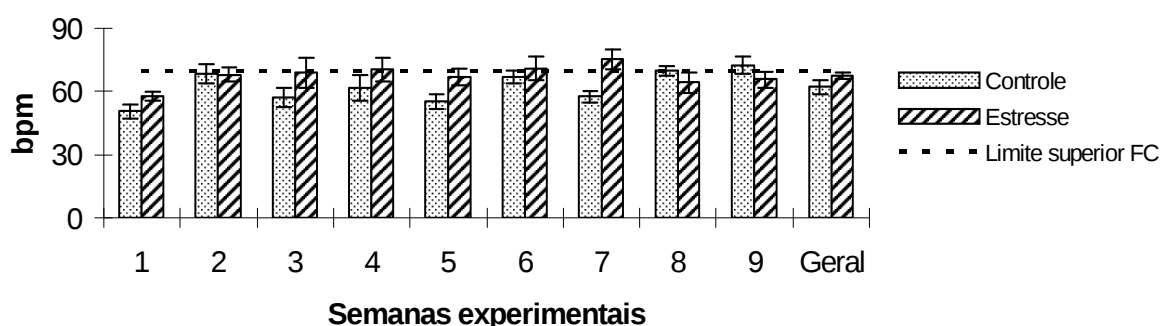
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 10. Valores médios e erros padrão da frequência cardíaca (batimentos por minuto) dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	50,4 ± 3,26 ^a	57,6 ± 1,84 ^a
2	68,4 ± 4,63 ^a	68,0 ± 3,31 ^a
3	57,2 ± 4,40 ^a	68,8 ± 6,97 ^a
4	61,6 ± 6,14 ^a	70,2 ± 5,48 ^a
5	55,2 ± 3,52 ^a	66,8 ± 3,95 ^a
6	66,8 ± 3,15 ^a	70,8 ± 5,68 ^a
7	57,6 ± 2,74 ^a	75,2 ± 4,90 ^a
8	69,6 ± 2,16 ^a	64,0 ± 4,70 ^a
9	72,4 ± 3,93 ^a	65,6 ± 3,69 ^a
Geral	62,13 ± 3,26 ^a	67,44 ± 1,51 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 10. Valores médios e erros padrão da frequência cardíaca (batimentos por minuto) dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A temperatura retal média da primeira avaliação do período de contenção não diferiu entre os grupos nas semanas experimentais ($p > 0,05$) (Tabela e figura 11).

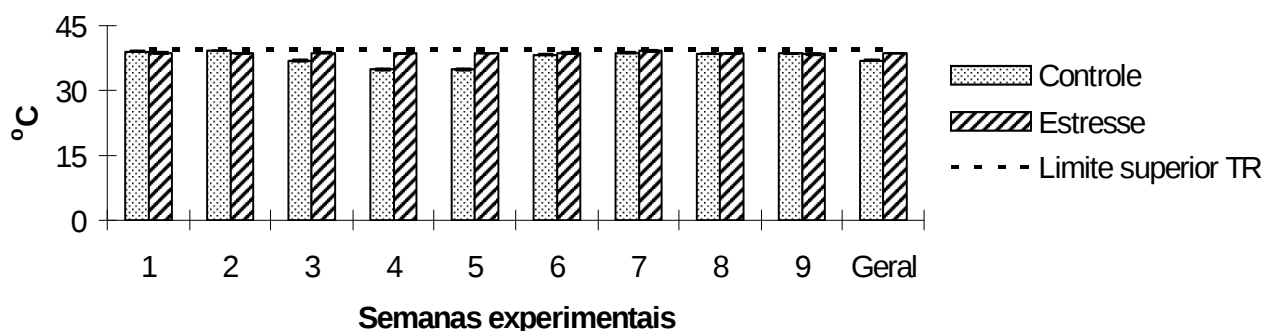
Contudo, esta variável modificou-se pelas influências da semana e do grupo experimental ($p \leq 0,05$). Não foram detectadas influências significativas da interação entre a semana e o grupo experimental ($p > 0,05$) (tabela 11).

Tabela 11. Valores médios e erros padrão da temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$), temperatura retal estimada, proporção e proporção estimada da temperatura retal dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais

Semanas	Controle (C)	Estresse (E)	Cont. Est.	Est. Est.	Prop. E/C	Prop. E/C Est.
1	38,97 $\pm$ 0,10 ^a	38,68 $\pm$ 0,15 ^a	39,11	38,59	0,99	0,99
2	39,20 $\pm$ 0,11 ^a	38,60 $\pm$ 0,14 ^a	39,06	37,57	0,98	0,96
3	36,96 $\pm$ 0,18 ^a	38,80 $\pm$ 0,16 ^a	38,45	38,59	1,05	1,00
4	34,87 $\pm$ 0,16 ^a	38,57 $\pm$ 0,14 ^a	37,79	38,34	1,11	1,01
5	34,84 $\pm$ 0,21 ^a	38,66 $\pm$ 0,07 ^a	37,70	38,36	1,11	1,02
6	38,24 $\pm$ 0,11 ^a	38,67 $\pm$ 0,16 ^a	38,55	38,33	1,01	0,99
7	38,80 $\pm$ 0,15 ^a	39,07 $\pm$ 0,24 ^a	38,71	38,36	1,01	0,99
8	38,51 $\pm$ 0,20 ^a	38,59 $\pm$ 0,14 ^a	38,55	38,17	1,00	0,99
9	38,62 $\pm$ 0,14 ^a	38,44 $\pm$ 0,14 ^a	38,49	38,10	1,00	0,99
Geral	37,00 $\pm$ 0,04 ^a	38,68 $\pm$ 0,04 ^a	38,99	38,60	1,05	0,99

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 11. Valores médios e erros padrão da temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

2.1.2 Indicadores endócrinos

Os valores médios da concentração plasmática do cortisol da primeira avaliação do período de contenção não diferiram ($p > 0,05$) entre os grupos durante as semanas experimentais, exceto na terceira semana, na qual os animais do grupo Estresse apresentaram maiores valores ($p \leq 0,01$) (tabela e figura 12).

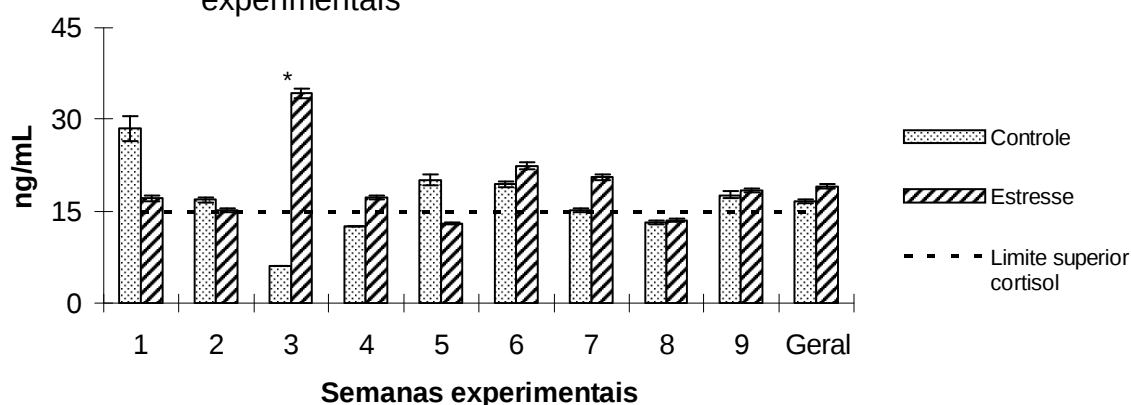
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p>0,05$).

Tabela 12. Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de cortisol (ng/mL) dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	28,5 ± 1,98 ^a	17,1 ± 0,44 ^a
2	16,9 ± 0,42 ^a	15,1 ± 0,38 ^a
3	6,1 ± 0,0 ^a	34,3 ± 0,73 ^b
4	12,5 ± 0,03 ^a	17,2 ± 0,34 ^a
5	20,1 ± 0,95 ^a	13,0 ± 0,21 ^a
6	19,4 ± 0,52 ^a	22,4 ± 0,55 ^a
7	15,1 ± 0,30 ^a	20,5 ± 0,50 ^a
8	13,1 ± 0,31 ^a	13,5 ± 0,27 ^a
9	17,6 ± 0,59 ^a	18,4 ± 0,39 ^a
Geral	16,6 ± 0,35 ^a	19,1 ± 0,32 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p\leq 0,01$)

Figura 12. Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de cortisol (ng/mL) dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p\leq 0,01$)

Os valores médios da concentração plasmática da progesterona da primeira avaliação do período de contenção não diferiram entre os grupos durante as semanas experimentais ($p>0,05$) (tabela e figura 13).

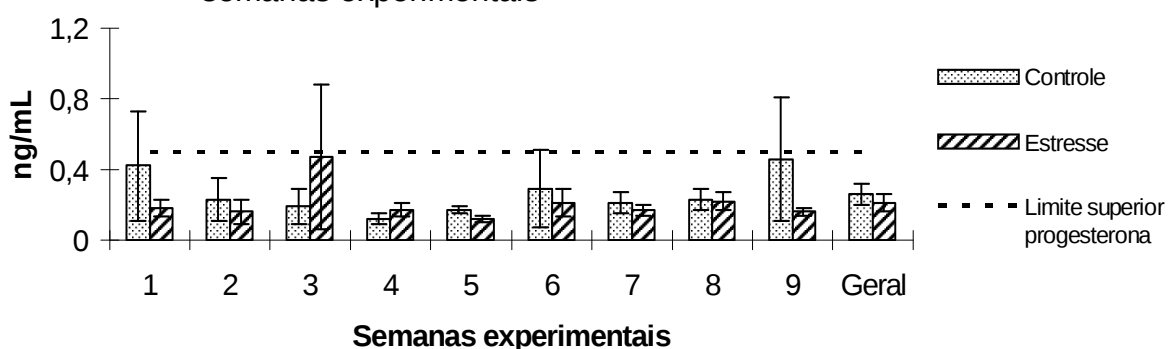
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p>0,05$).

Tabela 13. Valores médios e erros padrão da concentração plasmática da progesterona (ng/mL) dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	$0,42 \pm 0,31^a$	$0,18 \pm 0,05^a$
2	$0,23 \pm 0,12^a$	$0,16 \pm 0,07^a$
3	$0,19 \pm 0,10^a$	$0,47 \pm 0,41^a$
4	$0,12 \pm 0,03^a$	$0,17 \pm 0,04^a$
5	$0,17 \pm 0,02^a$	$0,12 \pm 0,02^a$
6	$0,29 \pm 0,22^a$	$0,21 \pm 0,08^a$
7	$0,21 \pm 0,06^a$	$0,17 \pm 0,03^a$
8	$0,23 \pm 0,06^a$	$0,22 \pm 0,05^a$
9	$0,46 \pm 0,35^a$	$0,16 \pm 0,02^a$
Geral	$0,26 \pm 0,06^a$	$0,21 \pm 0,05^a$

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,01$)

Figura 13. Valores médios e erros padrão da concentração plasmática da progesterona (ng/mL) dos animais dos grupos Controle e Estresse da primeira avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

2.2 Indicadores comportamentais

Durante o período de contenção de cinco minutos, a frequência de vocalizações não diferiu ($p>0,05$) entre os grupos experimentais, exceto na

sexta e sétima semanas, e na somatória das freqüências semanais, nas quais o grupo Estresse apresentou maiores valores ($p \leq 0,01$) (tabela e figura 14).

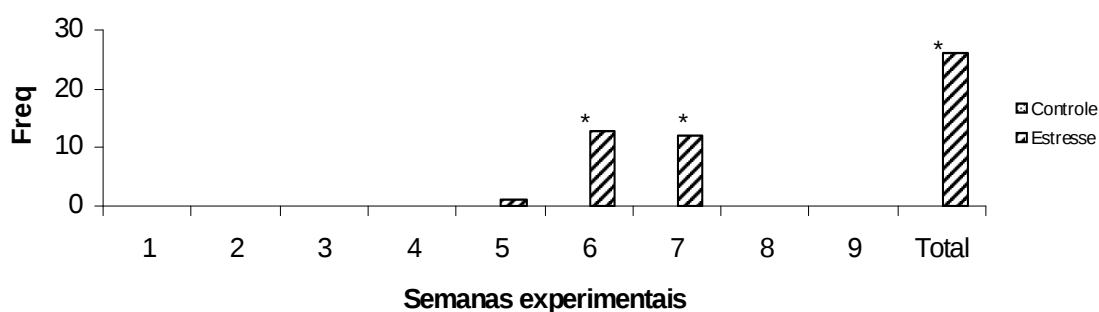
Ao longo do experimento, esta variável não foi influenciada pela semana, grupo ou interação entre semana e grupo ($p > 0,05$).

Tabela 14. Freqüência de vocalizações dos animais dos grupos Controle e Estresse no período de contenção nas semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	0 ^a	0 ^a
2	0 ^a	0 ^a
3	0 ^a	0 ^a
4	0 ^a	0 ^a
5	0 ^a	1 ^a
6	0 ^a	13 ^b
7	0 ^a	12 ^b
8	0 ^a	0 ^a
9	0 ^a	0 ^a
Total	0 ^a	26 ^b

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,01$)

Figura 14. Freqüência de vocalizações dos animais dos grupos Controle e Estresse no período de contenção nas semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,01$)

A freqüência de atitudes de deitar durante o período de contenção não diferiu ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais, exceto na nona semana e na somatória das freqüências semanais, nas quais foram observados maiores valores nos animais do grupo Estresse ($p \leq 0,01$) (tabela e figura 15).

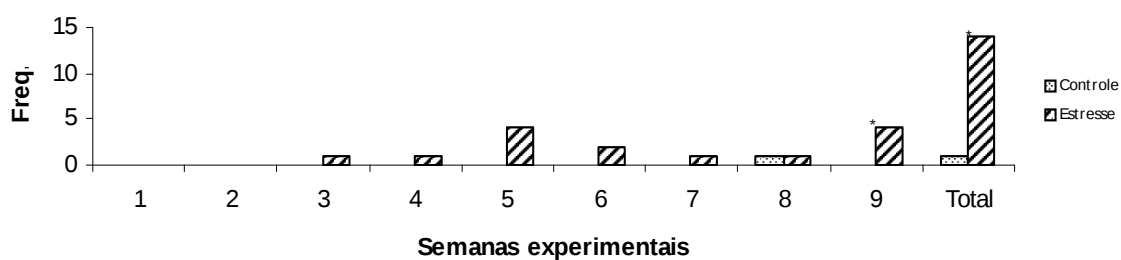
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, dos grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 15. Frequência de atitudes de deitar dos animais dos grupos Controle e Estresse no período de contenção nas semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	0 ^a	0 ^a
2	0 ^a	0 ^a
3	0 ^a	1 ^a
4	0 ^a	1 ^a
5	0 ^a	4 ^a
6	0 ^a	2 ^a
7	0 ^a	1 ^a
8	1 ^a	1 ^a
9	0 ^a	4 ^b
Total	1 ^a	14 ^b

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,01$)

Figura 15. Frequência de atitudes de deitar dos animais dos grupos Controle e Estresse no período de contenção nas semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,01$)

A frequência de exposições penianas e da glândula peniana foram maiores ($p \leq 0,01$) no grupo Estresse em todas as semanas experimentais, exceto na nona semana ($p > 0,05$) (tabela e figura 16).

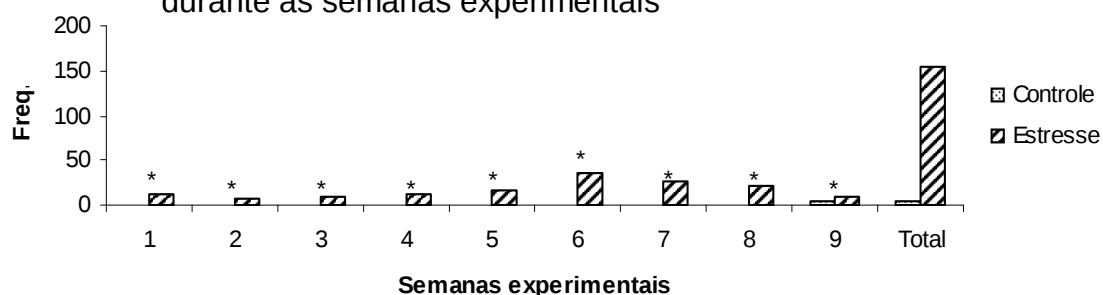
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 16. Frequência de exposições penianas e da glândula peniana dos animais dos grupos Controle e Estresse no período de contenção durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	0 ^a	12 ^b
2	0 ^a	8 ^b
3	0 ^a	10 ^b
4	0 ^a	12 ^b
5	0 ^a	18 ^b
6	0 ^a	36 ^b
7	0 ^a	26 ^b
8	0 ^a	22 ^b
9	5 ^a	10 ^b
Total	5 ^a	154 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,01$)

Figura 16. Frequência de exposições penianas e da glândula peniana dos animais dos grupos Controle e Estresse no período de contenção durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,01$)

Nos animais do grupo Estresse a estimulação elétrica transretal desencadeou a ejaculação e exposição peniana, respectivamente, em 66,66% e 65,55% dos procedimentos. Nos animais que ejacularam, o tempo médio para a obtenção da amostra seminal foi de 108,98 segundos.

2.3 Segunda avaliação dos indicadores fisiológicos

2.3.1 Indicadores não endócrinos

A frequência respiratória média da segunda avaliação do período de contenção não diferiu entre os grupos nas semanas experimentais ($p > 0,05$).

Contudo, o grupo Estresse apresentou médias gerais mais elevadas ($p \leq 0,05$) (tabela e figura 17).

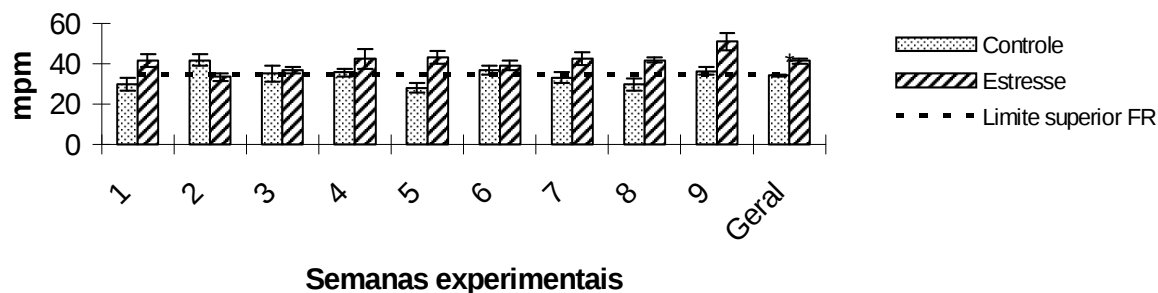
Esta variável modificou-se ao longo das semanas experimentais ($p \leq 0,05$), tendo sido observado o seu aumento nos animais dos grupos Controle e Estresse. Este efeito pode ser observado pela evolução da frequência respiratória estimada e da proporção estimada das frequências respiratórias entre os grupos Estresse e Controle. Não foram detectadas influências significativas do grupo e da interação entre a semana e o grupo experimental ($p > 0,05$) (tabela 17).

Tabela 17. Valores médios da frequência respiratória (movimentos por minuto), frequência respiratória estimada, proporção e proporção estimada da frequência respiratória dos animais dos grupos Controle e Estresse da segunda avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais

Semanas	Controle (C)	Estresse (E)	Cont. Est.	Est. Est.	Prop. E/C	Prop. E/C Est.
1	30,00 $\pm$ 3,07 ^a	41,60 $\pm$ 3,23 ^a	33,36	38,87	1,39	1,17
2	41,80 $\pm$ 3,01 ^a	33,60 $\pm$ 1,89 ^a	37,80	35,53	0,80	0,94
3	35,20 $\pm$ 3,90 ^a	36,80 $\pm$ 1,62 ^a	35,76	35,55	1,05	0,99
4	35,60 $\pm$ 1,78 ^a	42,40 $\pm$ 5,03 ^a	35,72	38,78	1,19	1,09
5	28,00 $\pm$ 2,37 ^a	43,20 $\pm$ 3,2 ^a	32,40	37,38	1,54	1,15
6	36,80 $\pm$ 2,29 ^a	39,20 $\pm$ 2,31 ^a	35,82	36,69	1,07	1,02
7	33,20 $\pm$ 2,60 ^a	42,80 $\pm$ 3,21 ^a	33,28	38,50	1,29	1,16
8	29,82 $\pm$ 2,81 ^a	41,78 $\pm$ 1,35 ^a	32,57	41,27	1,40	1,27
9	36,49 $\pm$ 1,90 ^a	51,11 $\pm$ 4,41 ^a	38,39	42,71	1,40	1,11
Geral	34,10 $\pm$ 0,65 ^a	41,38 $\pm$ 1,22 ^b	37,82	37,83	1,21	1,00

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 17. Valores médios e erros padrão da frequência respiratória (movimentos por minuto) dos animais dos grupos Controle e Estresse da segunda avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A frequência cardíaca média da segunda avaliação do período de contenção não diferiu entre os grupos nas semanas experimentais ($p > 0,05$). Contudo, o grupo Estresse apresentou médias gerais mais elevadas ($p \leq 0,01$) (tabela e figura 18).

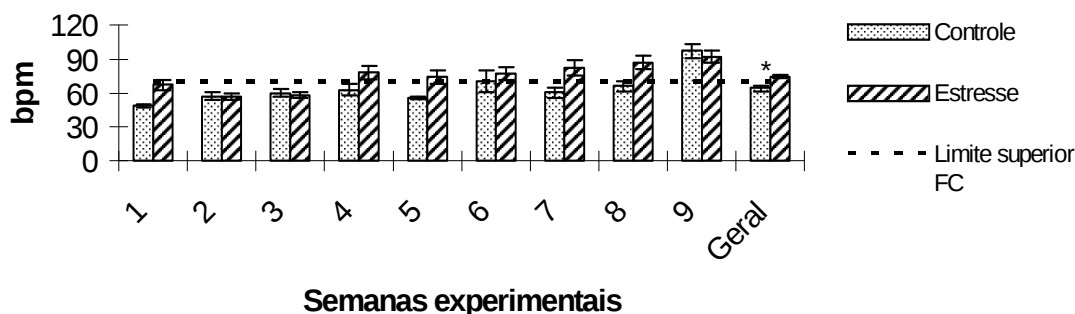
A variável modificou-se ao longo das semanas experimentais, tendo sido observada uma tendência de acréscimo no número de batimentos cardíacos a cada semana ($p \leq 0,05$) (tabela 18). Não houve influência do grupo e da interação entre a semana e grupo experimental ($p > 0,05$).

Tabela 18. Valores médios da frequência cardíaca (batimentos por minuto), frequência cardíaca estimada, proporção e proporção estimada da frequência cardíaca dos animais dos grupos Controle e Estresse da segunda avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais

Colheitas	Controle (C)	Estresse (E)	Cont. Est.	Est. Est.	Prop. E/C	Prop. E/C Est.
1	48,40 $\pm$ 1,74 ^a	67,20 $\pm$ 4,50 ^a	62,46	58,89	1,39	0,94
2	56,80 $\pm$ 3,46 ^a	56,40 $\pm$ 3,22 ^a	63,22	62,51	0,99	0,99
3	59,60 $\pm$ 3,37 ^a	57,70 $\pm$ 2,33 ^a	64,00	66,35	0,97	1,04
4	62,80 $\pm$ 5,21 ^a	78,00 $\pm$ 5,78 ^a	64,79	70,42	1,24	1,09
5	55,60 $\pm$ 1,28 ^a	74,40 $\pm$ 5,66 ^a	65,58	74,75	1,34	1,14
6	70,40 $\pm$ 9,78 ^a	77,20 $\pm$ 5,75 ^a	66,39	79,34	1,10	1,20
7	60,40 $\pm$ 4,4 ^a	82,00 $\pm$ 6,98 ^a	67,21	84,21	1,36	1,25
8	66,22 $\pm$ 4,35 ^a	86,80 $\pm$ 6,30 ^a	68,03	89,38	1,31	1,31
9	97,33 $\pm$ 6,15 ^a	92,00 $\pm$ 5,29 ^a	68,87	94,87	0,95	1,38
Geral	64,17 $\pm$ 2,39 ^a	74,63 $\pm$ 1,51 ^b	67,03	79,34	1,16	1,18

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,01$)

Figura 18. Valores médios e erros padrão da frequência cardíaca (batimentos por minuto) dos animais dos grupos Controle e Estresse da segunda avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,01$)

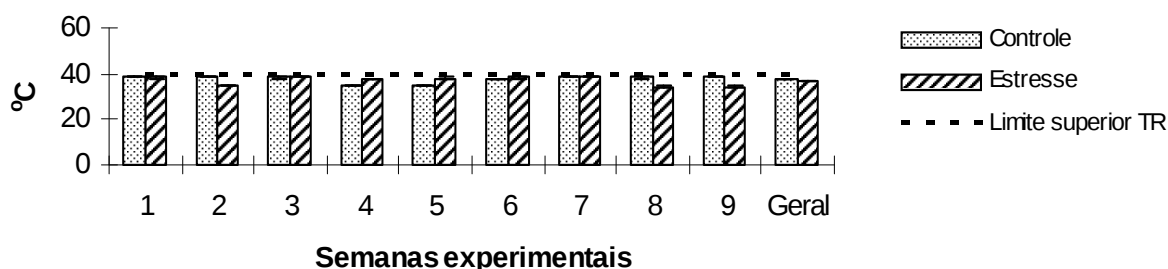
A temperatura retal média e as médias gerais da segunda avaliação do período de contenção não diferiu entre os grupos nas semanas experimentais ($p > 0,05$) (tabela e figura 19). Não houve influência da semana, do grupo ou da interação entre semana e grupo experimental ($p > 0,05$).

Tabela 19. Valores médios da temperatura retal ($^{\circ}\text{C}$) dos animais dos grupos Controle e Estresse da segunda avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	39,05 $\pm$ 0,09 ^a	38,28 $\pm$ 0,12 ^a
2	38,97 $\pm$ 0,08 ^a	34,63 $\pm$ 0,13 ^a
3	38,28 $\pm$ 0,12 ^a	38,67 $\pm$ 0,17 ^a
4	34,75 $\pm$ 0,08 ^a	37,94 $\pm$ 0,17 ^a
5	34,68 $\pm$ 0,18 ^a	38,20 $\pm$ 0,15 ^a
6	38,03 $\pm$ 0,08 ^a	38,36 $\pm$ 0,20 ^a
7	38,79 $\pm$ 0,15 ^a	38,61 $\pm$ 0,23 ^a
8	38,39 $\pm$ 0,19 ^a	34,31 $\pm$ 0,12 ^a
9	38,43 $\pm$ 0,04 ^a	34,24 $\pm$ 0,04 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 19. Valores médios e erros padrão da temperatura retal (°C) dos animais dos grupos Controle e Estresse da segunda avaliação do período de contenção durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

2.3.2 Indicadores endócrinos

Os valores médios da concentração plasmática do cortisol da segunda avaliação do período de contenção não diferiram entre os grupos durante as semanas experimentais ($p > 0,05$) (tabela e figura 20).

Os valores médios desta variável também não diferiram entre a primeira e segunda avaliações realizadas no grupo Controle ($p > 0,05$), exceto na segunda semana experimental, na qual observou-se que a segunda avaliação do período de contenção apresentou maior concentração média ($p \leq 0,05$) (figura 21). Contudo, quando os valores médios da primeira e segunda avaliações do grupo Estresse foram comparados, verificaram-se maiores concentrações médias na segunda avaliação ($p \leq 0,05$), exceto na segunda e terceira semanas, em que a diferença não foi detectada ($p > 0,05$) (figura 22). Os valores médios da concentração plasmática de cortisol da primeira avaliação do grupo Controle foram semelhantes aos observados na primeira avaliação do grupo Estresse ($p > 0,05$) (tabela 20).

Não foram detectadas influências significativas das semanas, dos grupos e da interação entre semana e grupo sobre esta variável ($p > 0,05$).

Tabela 20. Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de cortisol (ng/mL) da primeira e da segunda avaliações do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Grupo Controle		Grupo Estresse	
	I Avaliação	II Avaliação	I Avaliação	II Avaliação
1	28,5 ± 1,98 ^a ●	26,6 ± 1,59 ^a ■	17,1 ± 0,44 ^C ●	31,4 ± 0,69 ^D ■
2	16,9 ± 0,42 ^a ●	27,7 ± 0,62 ^b ■	15,1 ± 0,38 ^C ●	24,1 ± 0,47 ^C ■
3	06,1 ± 0 ^a ●	17,7 ± 0,83 ^a ■	34,3 ± 0,73 ^C ●	42,2 ± 1,14 ^C ■
4	12,5 ± 0,03 ^a ●	17,3 ± 0,46 ^a ■	17,2 ± 0,34 ^C ●	36,5 ± 0,69 ^D ■
5	20,1 ± 0,95 ^a ●	27,0 ± 1,46 ^a ■	13,0 ± 0,21 ^C ●	37,1 ± 0,72 ^D ■
6	19,4 ± 0,52 ^a ●	19,0 ± 0,74 ^a ■	22,4 ± 0,55 ^C ●	42,2 ± 0,68 ^D ■
7	15,1 ± 0,30 ^a ●	20,3 ± 0,70 ^a ■	20,5 ± 0,50 ^C ●	37,4 ± 0,58 ^D ■
8	13,1 ± 0,31 ^a ●	18,5 ± 0,85 ^a ■	13,5 ± 0,27 ^C ●	33,3 ± 0,69 ^D ■
9	17,6 ± 0,59 ^a ●	34,1 ± 1,33 ^a ■	18,4 ± 0,39 ^C ●	37,7 ± 0,32 ^D ■
Geral	16,6 ± 0,35 ^a ●	23,1 ± 0,85 ^a ■	19,1 ± 0,32 ^C ●	35,8 ± 0,52 ^D ■

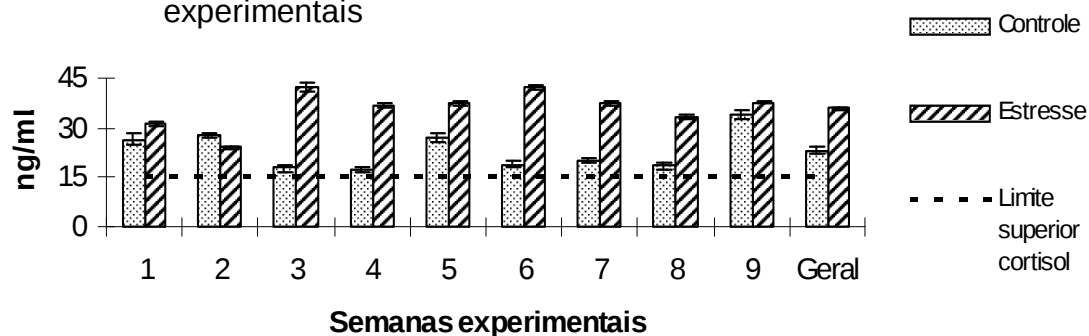
* letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

* letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

* símbolos (●, ○) diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

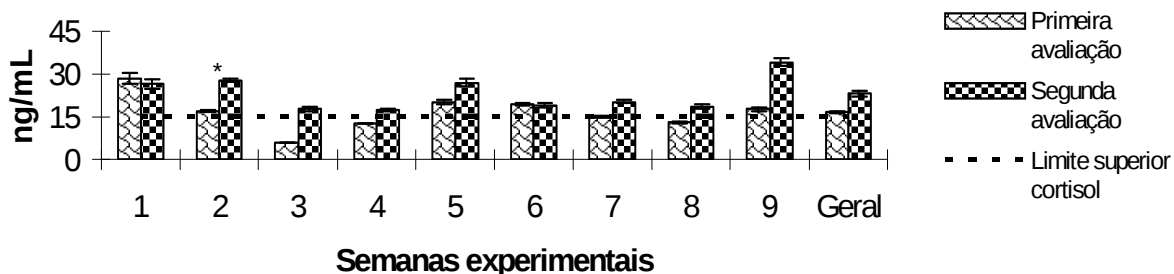
* símbolos (■, □) diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 20. Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de cortisol (ng/mL) da segunda avaliação do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



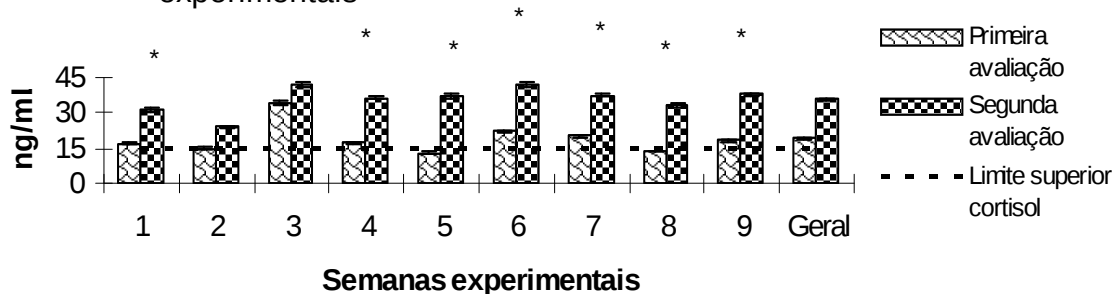
* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

Figura 21. Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de cortisol (ng/mL) da primeira e segunda avaliações do período de contenção dos animais do grupo Controle durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

Figura 22. Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de cortisol (ng/mL) da primeira e segunda avaliações do período de contenção dos animais do grupo Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

Os valores médios da concentração plasmática da progesterona da segunda avaliação do período de contenção não diferiram entre os grupos durante as semanas experimentais ($p > 0,05$), exceto na sexta semana, na qual a média do grupo Estresse foi superior ($p \leq 0,05$) (tabela e figura 23).

As médias desta variável também não diferiram entre si quando comparados os valores obtidos na primeira e segunda avaliações do período de contenção do Grupo Controle durante as semanas experimentais ($p > 0,05$) (figura 24). Contudo, quando realizada a comparação entre as médias da primeira e segunda avaliações do grupo Estresse, observou-se maiores valores na segunda avaliação ($p \leq 0,05$), exceto na primeira, quinta e sexta semanas, que foram semelhantes ($p > 0,05$) (figura 25). Os valores médios da

concentração plasmática de progesterona da primeira avaliação do grupo Controle foram semelhantes aos observados na primeira avaliação do grupo Estresse ($p>0,05$) (tabela 21).

Não foram detectadas influências significativas das semanas, grupos e da interação entre semana e grupo sobre esta variável ($p>0,05$).

Tabela 21. Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) da primeira e segunda avaliações do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Grupo Controle		Grupo Estresse	
	I Avaliação	II Avaliação	I Avaliação	II Avaliação
1	0,42 ± 0,31 ^a ●	0,48 ± 0,50 ^a ■	0,18 ± 0,05 ^C ●	0,60 ± 0,33 ^C ■
2	0,23 ± 0,12 ^a ●	0,36 ± 0,11 ^a ■	0,16 ± 0,07 ^C ●	0,25 ± 0,05 ^D ■
3	0,19 ± 0,10 ^a ●	0,31 ± 0,12 ^a ■	0,47 ± 0,41 ^C ●	1,01 ± 0,61 ^D ■
4	0,12 ± 0,03 ^a ●	0,16 ± 0,03 ^a ■	0,17 ± 0,04 ^C ●	0,59 ± 0,13 ^D ■
5	0,17 ± 0,02 ^a ●	0,48 ± 0,33 ^a ■	0,12 ± 0,02 ^C ●	0,42 ± 0,08 ^C ■
6	0,29 ± 0,22 ^a ●	0,21 ± 0,07 ^a ■	0,21 ± 0,08 ^C ●	0,35 ± 0,01 ^C ■
7	0,21 ± 0,06 ^a ●	0,29 ± 0,06 ^a ■	0,17 ± 0,03 ^C ●	0,39 ± 0,06 ^D ■
8	0,23 ± 0,06 ^a ●	0,29 ± 0,08 ^a ■	0,22 ± 0,05 ^C ●	0,47 ± 0,05 ^D ■
9	0,46 ± 0,35 ^a ●	0,92 ± 0,70 ^a ■	0,16 ± 0,02 ^C ●	0,49 ± 0,12 ^D ■
Geral	0,26 ± 0,06 ^a ●	0,39 ± 0,32 ^a ■	0,21 ± 0,05 ^C ●	0,51 ± 0,34 ^D ■

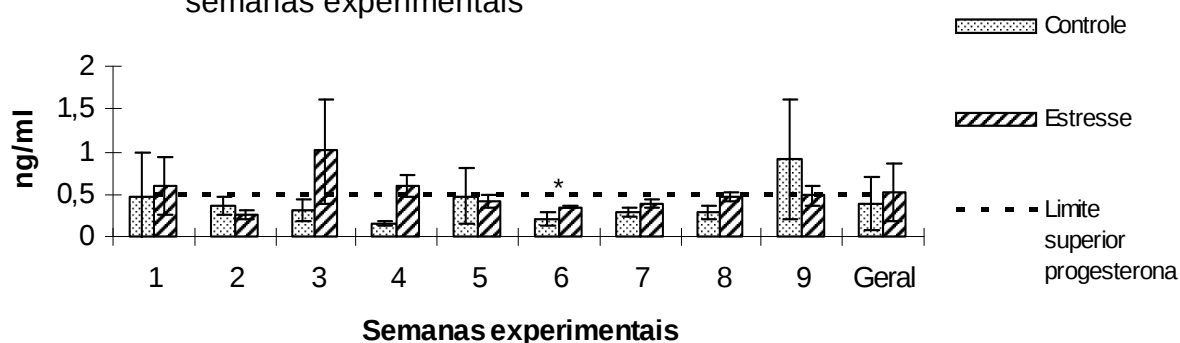
* letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p\leq 0,05$)

* letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p\leq 0,05$)

* símbolos (●, ○) diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p\leq 0,05$)

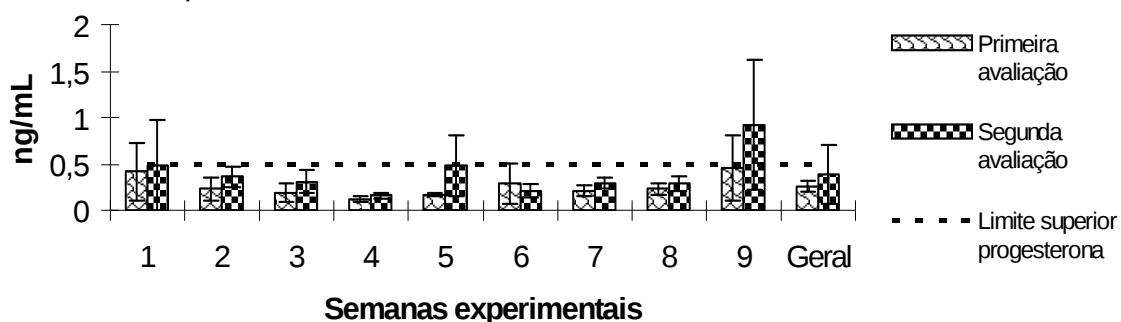
* símbolos (■, □) diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p\leq 0,05$)

Figura 23. Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) da segunda avaliação do período de contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



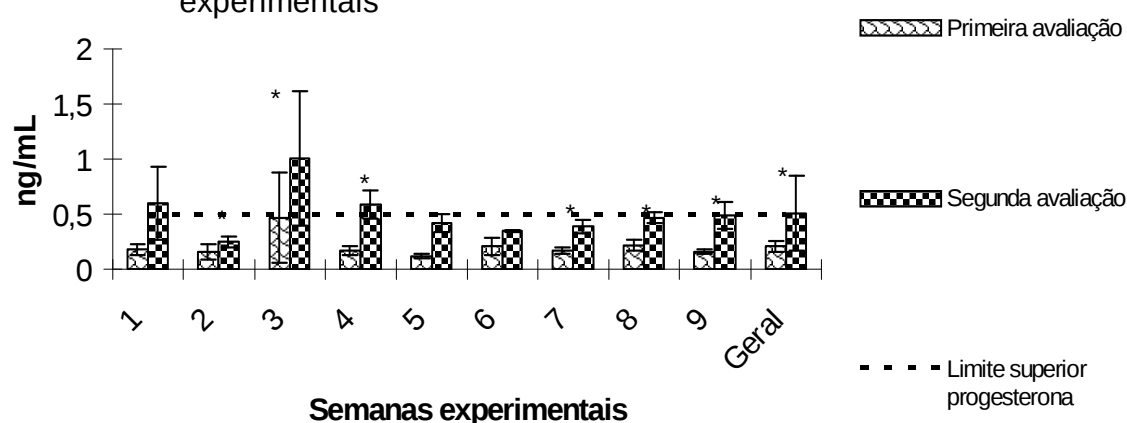
* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p\leq 0,05$)

Figura 24. Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) da primeira e segunda avaliações do período de contenção dos animais do grupo Controle durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

Figura 25. Valores médios e erros padrão da concentração plasmática de progesterona (ng/mL) da primeira e segunda avaliações do período de contenção dos animais do grupo Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A correlação entre as concentrações plasmáticas de cortisol e progesterona dos grupos Controle e Estresse foi igual a 0,6 ($p \leq 0,05$)

3. Período pós-contenção

3.1 Avaliação dos indicadores comportamentais

A frequência de abaixamento de cabeça do grupo Estresse foi maior que do grupo Controle ($p \leq 0,01$) em todas as semanas experimentais, exceto na terceira, quarta, sexta, oitava e nona semanas ($p > 0,05$) (tabela 22 e figura 26).

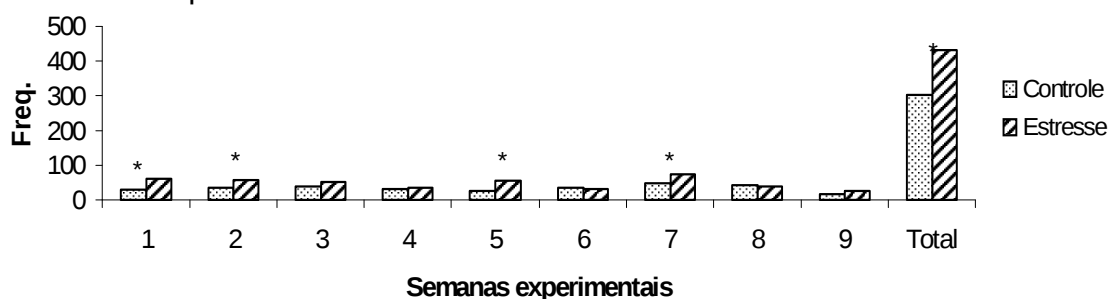
Esta variável não foi influenciada pela semana, grupo e interação entre semana e grupo experimental ($p > 0,05$).

Tabela 22. Frequência de abaixamento de cabeça no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	29 ^a	62 ^b
2	36 ^a	58 ^b
3	40 ^a	53 ^a
4	32 ^a	34 ^a
5	26 ^a	55 ^b
6	34 ^a	31 ^a
7	48 ^a	75 ^b
8	42 ^a	38 ^a
9	17 ^a	25 ^a
Total	304 ^a	431 ^b

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,01$)

Figura 26. Frequência de abaixamento de cabeça no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,01$)

A frequência de lambidas não diferiu ($p>0,05$) entre os grupos experimentais, exceto na primeira e segunda semanas, nas quais foi maior no grupo Estresse ($p\leq 0,01$) (tabela 23 e figura 27).

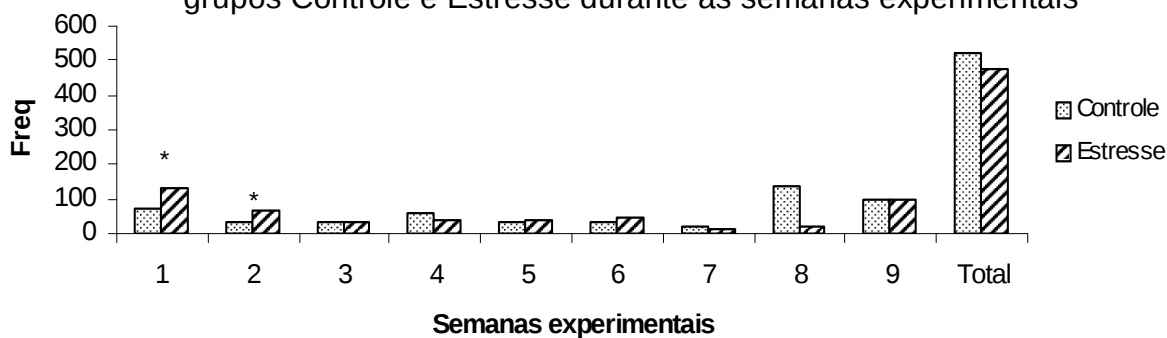
Esta variável não foi influenciada pela semana, grupo e interação entre semana e grupo experimental ($p>0,05$).

Tabela 23. Frequência de lambidas no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	71 ^a	129 ^b
2	31 ^a	65 ^b
3	35 ^a	30 ^a
4	60 ^a	38 ^a
5	32 ^a	37 ^a
6	35 ^a	46 ^a
7	22 ^a	15 ^a
8	139 ^a	17 ^a
9	99 ^a	98 ^a
Total	524 ^a	475 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p\leq 0,01$)

Figura 27. Frequência de lambidas no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p\leq 0,01$)

A frequência de cabeçadas no período pós-contenção não diferiu entre os grupos experimentais durante as semanas ($p>0,05$) (tabela 24 e figura 28).

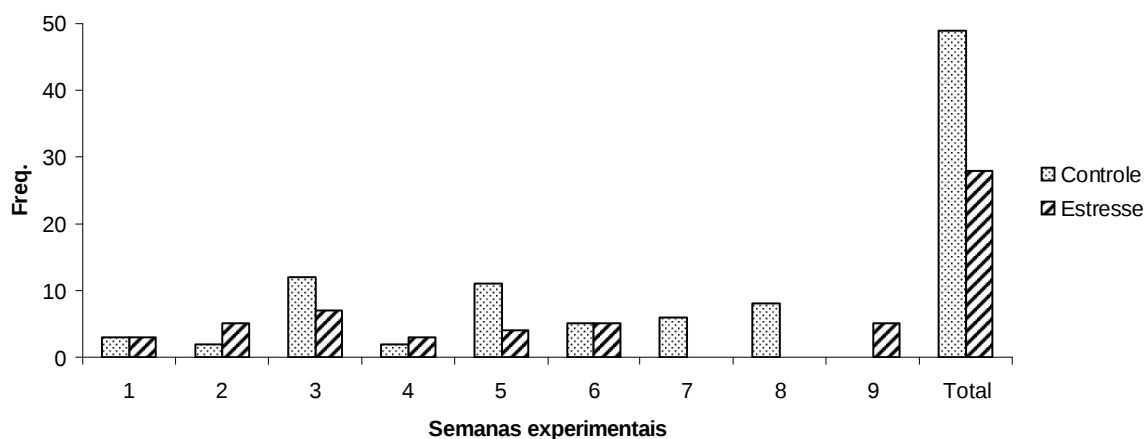
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p>0,05$).

Tabela 24. Frequência de cabeçadas no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	3 ^a	3 ^a
2	2 ^a	5 ^a
3	12 ^a	7 ^a
4	2 ^a	3 ^a
5	11 ^a	4 ^a
6	5 ^a	5 ^a
7	6 ^a	0 ^a
8	8 ^a	0 ^a
9	0 ^a	5 ^a
Total	49 ^a	28 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 28. Frequência de cabeçadas no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A frequência de coices no período pós-contenção não diferiu entre os grupos experimentais durante as semanas ($p > 0,05$) (tabela 25 e figura 29).

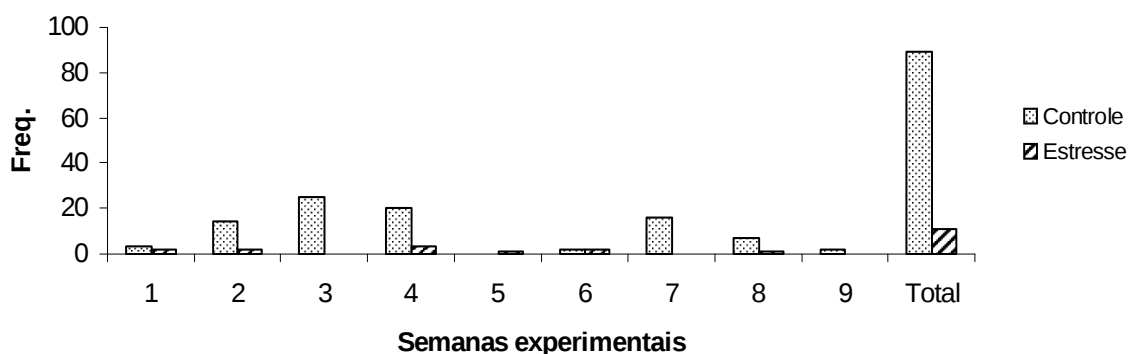
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 25. Frequência de coices no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	3 ^a	2 ^a
2	14 ^a	2 ^a
3	25 ^a	0 ^a
4	20 ^a	3 ^a
5	0 ^a	1 ^a
6	2 ^a	2 ^a
7	16 ^a	0 ^a
8	7 ^a	1 ^a
9	2 ^a	0 ^a
Total	89 ^a	11 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 29. Frequência de coices no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A frequência de defecações no período pós-contenção não diferiu entre os grupos experimentais durante as semanas ($p > 0,05$) (tabela 26 e figura 30).

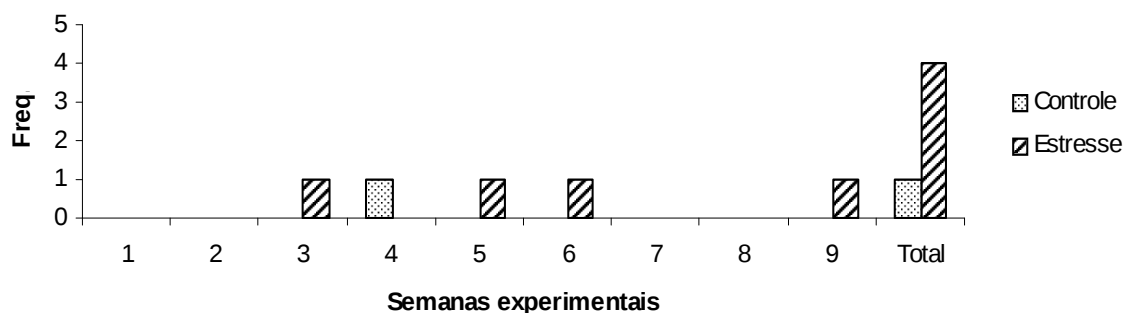
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 26. Frequência de defecações no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	0 ^a	0 ^a
2	0 ^a	0 ^a
3	0 ^a	1 ^a
4	1 ^a	0 ^a
5	0 ^a	1 ^a
6	0 ^a	1 ^a
7	0 ^a	0 ^a
8	0 ^a	0 ^a
9	0 ^a	1 ^a
Total	1 ^a	4 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 30. Frequência de defecações no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A frequência de fugas no período pós-contenção não diferiu entre os grupos experimentais durante as semanas ($p > 0,05$) (tabela 27 e figura 31).

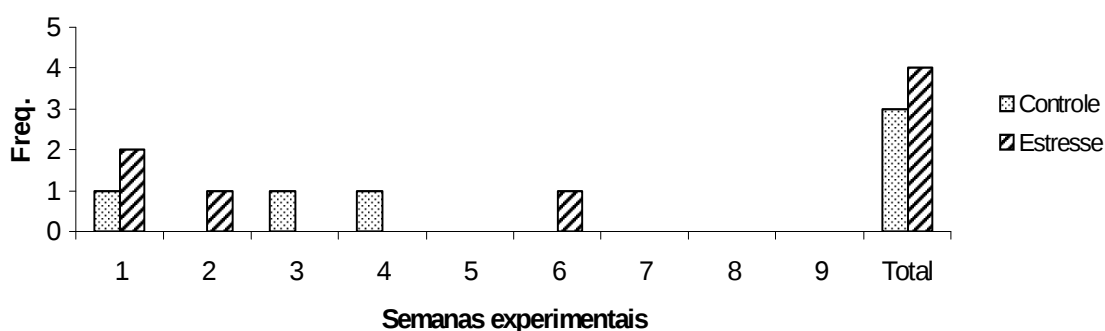
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 27. Frequência de fugas no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	1 ^a	2 ^a
2	0 ^a	1 ^a
3	1 ^a	0 ^a
4	1 ^a	0 ^a
5	0 ^a	0 ^a
6	0 ^a	1 ^a
7	0 ^a	0 ^a
8	0 ^a	0 ^a
9	0 ^a	0 ^a
Total	3 ^a	4 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 31. Frequência de fugas no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A frequência de micção no período pós-contenção não diferiu entre os grupos experimentais durante as semanas ($p > 0,05$) (tabela 28 e figura 32).

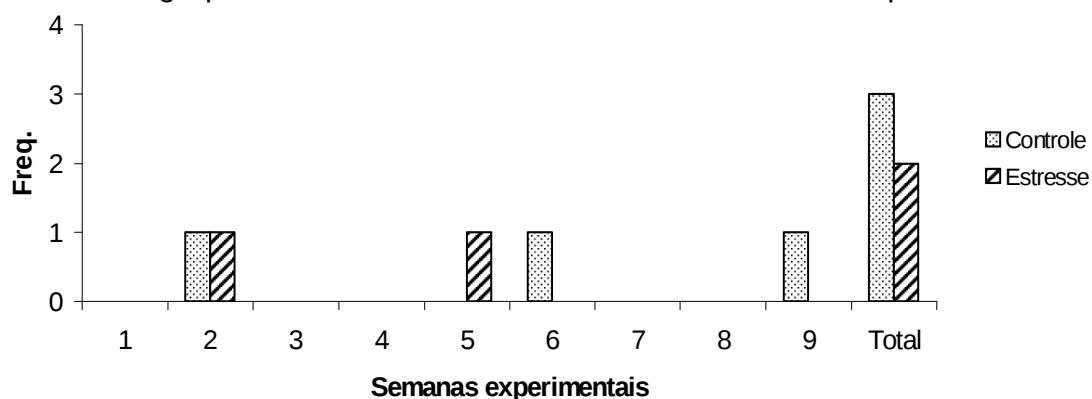
Para esta variável não foram verificados efeitos das semanas, grupos ou da interação entre semanas e grupos ($p > 0,05$).

Tabela 28. Frequência de micção no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	0 ^a	0 ^a
2	1 ^a	1 ^a
3	0 ^a	0 ^a
4	0 ^a	0 ^a
5	0 ^a	1 ^a
6	1 ^a	0 ^a
7	0 ^a	0 ^a
8	0 ^a	0 ^a
9	1 ^a	0 ^a
Total	3 ^a	2 ^a

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 32. Frequência de micção no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A frequência de salvação moderada não diferiu ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais, exceto na sexta semana e na somatória das frequências, nas quais foi maior no grupo Estresse ($p \leq 0,01$) (tabela 29 e figura 33).

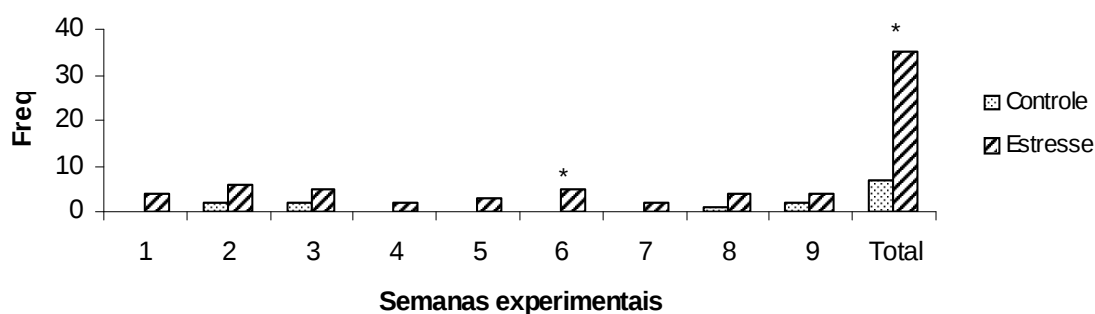
Esta variável não foi influenciada pela semana, grupo e interação entre semana e grupo experimental ($p > 0,05$).

Tabela 29. Frequência de salivação moderada no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	0 ^a	4 ^a
2	2 ^a	6 ^a
3	2 ^a	5 ^a
4	0 ^a	2 ^a
5	0 ^a	3 ^a
6	0 ^a	5 ^b
7	0 ^a	2 ^a
8	1 ^a	4 ^a
9	2 ^a	4 ^a
Total	7 ^a	35 ^b

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,01$)

Figura 33. Frequência de salivação moderada no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,01$)

A frequência de salivação excessiva não diferiu ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais, exceto a sua somatória que foi maior no grupo Estresse ($p \leq 0,01$) (tabela 30 e figura 34).

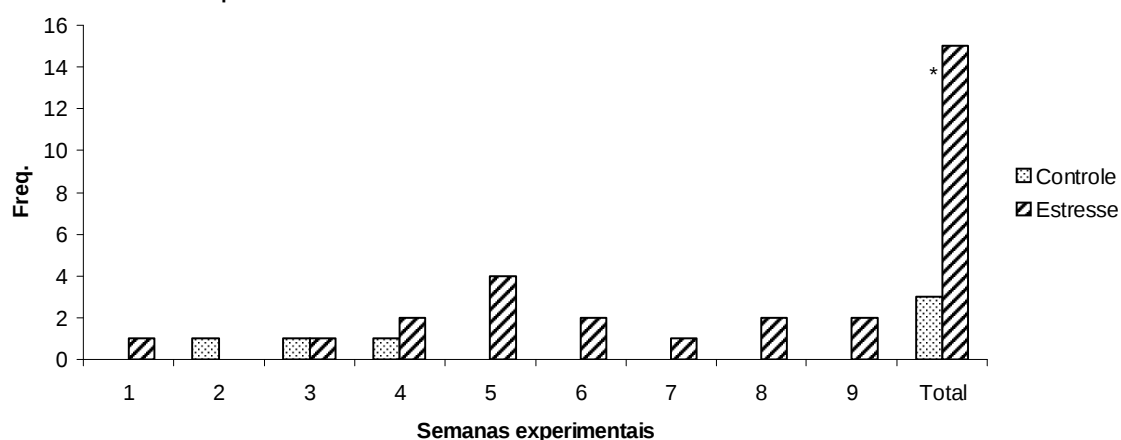
Esta variável foi influenciada pelas semanas ($p \leq 0,05$) (tabela 30). Contudo, o grupo e a interação entre semana e grupo experimental não influenciaram a frequência de salivação excessiva ($p > 0,05$).

Tabela 30. Frequência, somatória da frequência de salivação excessiva, proporção e proporção estimada da frequência de salivação excessiva dos animais dos grupos Controle e Estresse no período pós-contenção durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse	Proporção E/C	Prop.E/C Estimada
1	0 ^a	1 ^a	--	2,30
2	1 ^a	0 ^a	0	1,07
3	1 ^a	1 ^a	1	0,50
4	1 ^a	2 ^a	2	0,23
5	0 ^a	4 ^a	--	0,10
6	0 ^a	2 ^a	--	0,05
7	0 ^a	1 ^a	--	0,02
8	0 ^a	2 ^a	--	0,01
9	0 ^a	2 ^a	--	0,005
Total	3 ^a	15 ^b	5	0,004

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$)

Figura 34. Frequência de salivação excessiva dos animais dos grupos Controle e Estresse no período pós-contenção durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

A frequência de mugidos do grupo Estresse foi maior que do grupo Controle na segunda, quarta, quinta e sexta semanas, e quando comparada a somatória da frequência de mugidos ($p \leq 0,01$) (tabela 31 e figura 35).

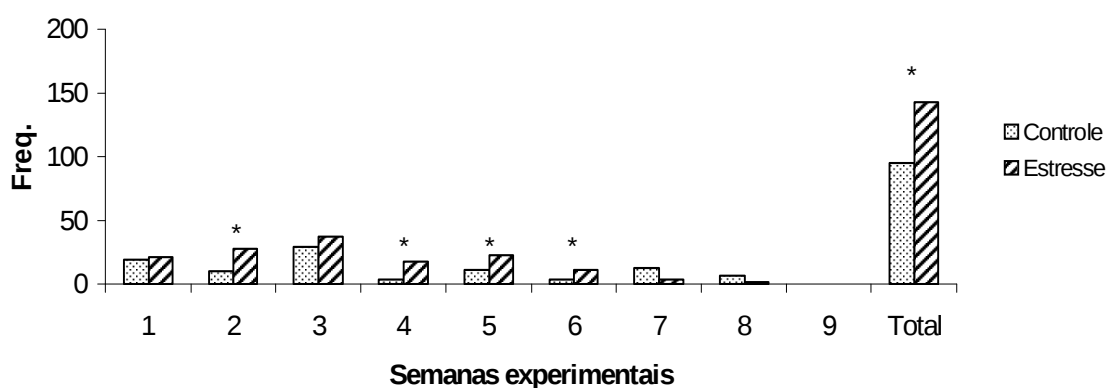
Esta variável não foi influenciada pela semana, grupo e interação entre semana e grupo experimental ($p > 0,05$).

Tabela 31. Frequência de mugidos no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais

Semanas	Controle	Estresse
1	19 ^a	21 ^a
2	10 ^a	28 ^b
3	29 ^a	37 ^a
4	3 ^a	18 ^b
5	11 ^a	23 ^b
6	3 ^a	11 ^b
7	13 ^a	3 ^a
8	7 ^a	2 ^a
9	0 ^a	0 ^a
Total	95 ^a	143 ^b

* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,01$)

Figura 35. Frequência de mugidos no período pós-contenção dos animais dos grupos Controle e Estresse durante as semanas experimentais



* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,01$)

Discussão

DISCUSSÃO

O número de estudos relacionados à avaliação das questões referentes ao bem-estar animal vem aumentando nos últimos anos devido principalmente às mudanças no conhecimento da fisiologia e de como esta se modifica quando os animais são submetidos a condições estressantes.

Nos animais de produção são várias as áreas de estudo que tentam relacionar práticas comumente empregadas com o desencadeamento de estresse e as consequências deste na produtividade. Uma dessas práticas é a eletroejaculação como procedimento para a obtenção de amostras seminais.

No presente estudo, os indicadores comportamentais de bem-estar avaliados no período pré-contenção, de maneira geral, não foram influenciados pela estimulação elétrica transretal semanal.

Os indicadores empregados vêm sendo utilizados nas avaliações de bem-estar envolvendo a espécie bovina (FALK et al., 2001; MOUNIER et al., 2005); contudo, todos esses estudos foram realizados em touros de raças européias. A ausência de alterações significativas dessas variáveis comportamentais durante o período pré-contenção, remete a duas possibilidades: a estimulação elétrica transretal semanal por nove semanas não altera a expressão desses comportamentos ou as variáveis empregadas não são bons indicadores comportamentais de estresse para *Bos taurus indicus*.

Considerando-se a primeira hipótese, esta sugere que não existe uma “memória” desagradável relacionada às experiências anteriores de submissão às sessões de eletro-choque transretais. O fato de não ter sido evidenciado efeito de semana em nenhuma das variáveis, exceto da frequência de abaixamento de cabeça, que aumentou no grupo Controle e diminuiu no grupo Estresse ao longo do estudo, reforça esta hipótese. Mosure et al. (1998), não verificaram o aumento da aversão dos animais em retornar às instalações em que foram realizadas as sessões sucessivas de EEJ. Este resultado também sugere a ausência de um efeito de “memória”.

A segunda hipótese, de que os indicadores comportamentais escolhidos não são representativos de estresse para o Nelore, deve ser analisada considerando os indicadores de forma individual.

O comportamento mais observado nos animais durante as semanas experimentais foi a frequência de abaixamento de cabeça [somatória: 150/90 avaliações (111%) - grupo Controle e 216/90 (250%) - grupo Estresse]. A expressão deste comportamento relaciona-se com a presença do observador ou de outro animal ou denota um estado de atenção ao ambiente imposto ao animal (KENNY & TARRANT, 1987; RUIS et al., 2001).

Os indicadores, frequência de lambidas, de cabeçadas, de coices e de mugidos, relacionados à interação social entre os animais do grupo, foram de baixa expressão neste período. Provavelmente estes comportamentos podem funcionar como bons indicadores de estresse em situações de convivência forçada (ex: realocação em novos grupos, confinamentos), nas quais existe a necessidade de interações individuais para o estabelecimento da hierarquia grupal. Contudo, esses indicadores não parecem ser de alta expressão em situações de confronto. Esta possibilidade é reforçada pelos estudos de Kenny & Tarrant (1987), Munksgaard et al. (1999) e Mounier et al. (2005) que observaram o aumento da expressão destes comportamentos em touros europeus reagrupados ou realocados em novos ambientes.

Os indicadores relacionados ao medo, como a frequência de defecações, de fugas e de micções, foram de baixa expressão em ambos os grupos experimentais. Estes achados sugerem que o medo não foi predominante nos animais neste período.

Considerando-se as duas hipóteses em conjunto, os resultados sugerem que, com exceção do abaixamento de cabeça, os indicadores comportamentais de bem-estar animal empregados não são adequados para avaliação de estresse desencadeado por situações de enfrentamento, de adaptação ou de readaptação aguda a um ambiente desconhecido e potencialmente perigoso. O abaixamento de cabeça funcionou como um bom indicador neste tipo de situação, contudo, sua expressão não foi exacerbada pela estimulação elétrica transretal.

As elevações das frequências respiratória (FURMAN et al., 1975, RADOSTITIS, 2000) e cardíaca (KENNY & TARRANT, 1987; MOSURE et al.,

1998, Palmer et al., 2005) e da temperatura retal (KENNY & TARRANT, 1987; MCDONALD, 1989b, RADOSTITS, 2000) são consideradas indicadoras de estresse nos bovinos. A não observação de alterações nestas variáveis durante a primeira avaliação do período de contenção e a não observação de influências relacionadas à semana, ao grupo ou à interação entre semana e grupo, exceto na frequência respiratória que sofreu influência da semana e diminuiu ao longo do período experimental nos dois grupos, sugere que a estimulação elétrica transretal semanal por nove semanas não altera a expressão destas variáveis fisiológicas por não gerar uma “memória” desagradável relacionada às experiências anteriores de submissão às sessões de eletro-choque transretais.

O comportamento semelhante destas variáveis nos dois grupos experimentais não descarta, contudo, a ausência de estresse, pois quando as observações dos grupos Controle e Estresse foram consideradas conjuntamente, pode-se observar que a média da frequência respiratória esteve muito próxima ou superior aos limites considerados fisiológicos para os bovinos em 55,55% (10/18) das avaliações e a média da frequência cardíaca também apresentou este comportamento em 50% (9/18) das avaliações. Portanto, se os animais estavam estressados, inclusive já nas primeiras avaliações, este efeito foi provocado pelo manejo a que os animais foram submetidos, e não pela(s) eletro estimulação(ões) transretal(is) da(s) semana(s) anterior(es).

As elevações das concentrações plasmáticas de cortisol (KENNY & TARRANT, 1986; MUNKSGAARD et al., 1999; ETSON et al., 2004; PALMER, 2005) e de progesterona (ETSON et al., 2004; PALMER, 2005) em machos bovinos europeus são também consideradas indicadores endócrinos de estresse.

A semelhança dos indicadores fisiológicos não endócrinos aferidos na primeira avaliação do período de contenção, os indicadores endócrinos durante este período também não foram influenciados pela estimulação elétrica transretal da(s) semana(s) anterior(es), exceto na terceira semana experimental, na qual foi verificada maior concentração média de cortisol no grupo Estresse. O comportamento semelhante das variáveis endócrinas em relação às não endócrinas durante a primeira avaliação do período de

contenção reforça a hipótese de que a estimulação elétrica transretal não gerou uma “memória” desagradável relacionada às experiências anteriores.

Resultados semelhantes aos deste estudo foram verificados por Etson et al. (2004), que não evidenciaram a elevação das concentrações plasmáticas de cortisol imediatamente antes a utilização da EEJ convencional em touros europeus submetidos a colheitas diárias de sêmen por duas semanas consecutivas.

O comportamento semelhante das concentrações plasmáticas de cortisol nos dois grupos experimentais também não descarta, contudo, a ausência de estresse, pois quando os valores médios dos grupos Controle e Estresse foram considerados conjuntamente, pode-se observar que as concentrações plasmáticas de cortisol estiveram superiores aos limites considerados fisiológicos para os bovinos de origem européia (15 ng/ml – GRANDIN, 1997; SILVEIRA et al., 2006) em 77,7% (14/18) das avaliações.

Durante os procedimentos de colheita de sêmen por EEJ os indicadores comportamentais, frequência de vocalização e de atitudes de deitar são consideradas indicadores de sensação dolorosa ou de desconforto nos bovinos (MOSURE et al., 1998; FALK et al., 2001; FISCHER et al., 2001; PALMER, 2005).

A presença de alterações significativas dessas variáveis comportamentais durante o período de contenção, na sexta e sétima semanas e na somatória, nas quais o grupo Estresse apresentou maiores valores de frequência de vocalização, e na nona semana e somatória, nas quais o grupo Estresse apresentou maiores frequências de atitude de deitar, remete à hipótese que a estimulação elétrica transretal foi suficientemente desagradável para desencadear essas alterações comportamentais em Nelore.

Os resultados obtidos neste estudo foram diferentes dos observados por Falk et al. (2001) e Etson et al. (2004) que não verificaram associação entre frequência de vocalização e de atitude de deitar no período de contenção e a realização da EEJ convencional em touros europeus. Entretanto, os resultados foram semelhantes aos verificados por Mosure et al. (1998) que encontraram aumento significativo da frequência de vocalizações e de atitudes de deitar durante as colheitas de sêmen por EEJ em touros *Bos taurus taurus*. Os

autores só conseguiram minimizar este efeito com o emprego de bloqueio anestésico epidural momentos antes da EEJ.

As exposições penianas em animais sexualmente maduros durante a colheita de sêmen por EEJ indica que o procedimento estimulou adequadamente a inervação responsável pela sequência de eventos relacionados à ereção, ao relaxamento do músculo retrator do pênis e à ejaculação (ESTON et al., 2004; PALMER, 2005; SARTORI et al., 2005).

A elevada frequência de exposições penianas durante a estimulação elétrica transretal nos animais do grupo Estresse (171,11% - 154 exposições /90 avaliações) e nos animais do grupo Controle na nona semana (55,55% - 5/9), e a taxa de obtenção seminal de 66,66% sugerem que a técnica de eletroejaculação empregada foi adequada.

Falk et al. (2001) e Etson et al. (2004) observaram, respectivamente, a ejaculação em 93,31% e 100% dos touros *Bos taurus taurus* submetidos a EEJ diária por duas semanas consecutivas. Uma possível explicação para a menor taxa de ejaculação observada nos Nelore no presente estudo foi a padronização do tempo de eletroestimulação em cinco minutos, enquanto que nos estudos citados a estimulação foi mantida até que os animais ejaculassem.

A estimulação elétrica transretal não elevou as frequências de movimentos respiratórios e de batimentos cardíacos e a temperatura transretal semanais da segunda avaliação do período de contenção. Contudo, o grupo Estresse apresentou maiores valores médios gerais para as frequências respiratória e cardíaca. Este fato, associado a constatação de que a média da frequência respiratória foi superior aos limites considerados fisiológicos para os bovinos em 55,55% (5/9) das avaliações do grupo Controle e 88,88% (8/9) das avaliações do grupo Estresse, e da média da frequência cardíaca ter sido superior aos limites fisiológicos em 33,33% (3/9) das avaliações do grupo Controle e em 66,66% (6/9) do grupo Estresse, sugere que EEJ foi um procedimento estressante.

O fato de ter sido detectado um efeito de semana sobre as variáveis, que resultou na elevação das frequências cardíaca e respiratória ao longo do experimento, sugere que houve um efeito de “memória”. Contudo, o efeito semelhante detectado nos dois grupos experimentais, sinaliza que o manejo geral dos grupos associados ou não à EEJ influenciou as variáveis.

Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Kenny & Tarrant (1987) que observaram alterações nos indicadores fisiológicos não-endócrinos ao transportar, reagrupar ou realocar animais *Bos taurus taurus*.

Os resultados também foram semelhantes aos observados por Mosure et al. (1998) que observaram maiores frequências de batimentos cardíacos em touros europeus submetidos à eletroejaculação convencional, quando comparados com animais que sofreram massagem das glândulas acessórias ou eletroejaculação associada à anestesia epidural utilizando lidocaína associada ou não a xilazina.

Quando comparados os valores médios das concentrações plasmáticas de cortisol e da progesterona dos grupos na segunda avaliação do período de contenção nas semanas experimentais, a semelhança do observado na primeira avaliação, não foram detectadas diferenças significativas, exceto na sexta semana experimental, na qual foi verificada maior concentração média da concentração plasmática da progesterona no grupo Estresse.

Contudo, quando comparadas as concentrações plasmáticas de cortisol da primeira e segunda avaliações do período de contenção, dentro de cada grupo experimental, verificou-se que no grupo Controle, apenas na segunda semana houve aumento significativo, enquanto que para o grupo Estresse, em todas as semanas, com exceção da segunda e terceira, a segunda avaliação mostrou valores superiores. A diferença entre os dois grupos fica também evidente quando considerada a média geral, que foi semelhante entre as duas avaliações no grupo Controle e superior na segunda avaliação do grupo Estresse.

Em relação à concentração média da progesterona observou-se um comportamento semelhante, pois no grupo Controle em nenhuma semana e na média geral houve diferença significativa entre a primeira e segunda avaliações do período de contenção, enquanto que no grupo Estresse, em todas as semanas e na média geral, com exceção da primeira, quinta e sexta semanas, verificou-se um aumento significativo desta variável na segunda avaliação. Achados semelhantes foram também encontrados por Cooper et al. (1995), Falk et al. (2001), Etson et al. (2004), e Palmer (2005), que verificaram a elevação significativa do cortisol e da progesterona plasmáticos nas amostras colhidas imediatamente após a utilização da EEJ convencional.

A semelhança do observado durante o período pré-contenção, os indicadores comportamentais de estresse avaliados no período pós-contenção, não foram alterados significativamente, com exceção da frequência de abaixamento de cabeça, que foi maior no grupo Estresse na primeira, segunda, quinta e sétima semanas, e de mugidos na segunda, quarta, quinta e sexta semanas e na somatória das semanas.

A baixa expressão dos demais indicadores comportamentais, como previamente observada durante a avaliação do período pré-contenção, reforça a hipótese anteriormente mencionada de que estes comportamentos são melhores indicadores de estresse em situações de convivência forçada (frequência de lambidas, de cabeçadas, de coices e de mugidos) ou de medo (frequência de defecações, micção). Kenny & Tarrant (1987), Munksgaard et al. (1999), Falk et al. (2001) e Mounier et al. (2005) também sugerem o mesmo para bovinos de origem européia.

Os comportamentos mais observados nos animais, que foi a frequência de abaixamento de cabeça [somatória: 304/90 (337%) - grupo Controle e 431/90 (478%) – grupo Estresse] e de mugidos (somatória: 95/90 (105%) – grupo Controle e 143/90 (158%) – grupo Estresse], os quais como já mencionados relacionam-se com a presença do observador e denotam um estado de atenção ao ambiente (KENNY & TARRANT, 1986; RUIS et al., 2001; MARAHRENS et al., 2003; SILVEIRA et al., 2006), foram exacerbados pela estimulação elétrica nos animais submetidos ao procedimento.

Estes resultados reforçam os resultados encontrados para os indicadores endócrinos de bem-estar da segunda avaliação do período de contenção, que indicaram o efeito estressor da estimulação elétrica pela eletroejaculação.

A ausência de efeito de semana, de grupo e da interação entre semana e grupo experimental sobre as variáveis comportamentais pós-contenção, reforçam a hipótese levantada neste estudo e nos trabalho de Mosure et al. (1998) que não há “memória” desagradável relacionada às estimulações elétricas transretais anteriores.

A maior intensidade de salivação moderada e excessiva observada nos animais do grupo Estresse durante o período pós-contenção, quando

consideradas as somatórias das semanas experimentais, provavelmente reflete uma maior atividade das glândulas salivares devido à estimulação parassimpática (RANDALL, 2000).

Conclusão

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e nas condições em que o experimento foi realizado, foi possível concluir que:

Quanto ao efeito de “memória” pela utilização da EEJ:

- não houve elevação da frequência da expressão dos indicadores comportamentais de bem-estar animal do período pré-contenção ao longo das semanas experimentais;
- não alterou os indicadores fisiológicos não endócrinos de bem-estar animal (as frequências respiratória e cardíaca e temperatura retal) da primeira avaliação do período de contenção ao longo das semanas experimentais;
- não houve alteração dos indicadores fisiológicos endócrinos de bem-estar animal (concentrações plasmáticas de cortisol e de progesterona) da primeira avaliação do período de contenção ao longo das semanas experimentais;
- alterou os indicadores comportamentais de bem-estar animal (frequência de vocalizações e de atitudes de deitar abaixamento de cabeça) do período de contenção nos animais submetidos a eletroejaculação;

Quanto à resposta imediata aos procedimentos de manejo aplicados associados ou não a EEJ:

- alterou os indicadores fisiológicos não-endócrinos (frequências respiratória e cardíaca) de bem-estar animal da segunda avaliação do período de contenção nos animais submetidos a eletroejaculação;

- o conjunto de procedimentos de manejo aplicados aos dois grupos experimentais desencadeou o aumento das frequências respiratória e cardíaca da segunda avaliação do período de contenção no transcorrer do experimento;
- a concentração plasmática dos indicadores fisiológicos endócrinos de bem-estar animal (cortisol e progesterona) elevou-se imediatamente nos animais submetidos à eletroejaculação;
- a frequência de abaixamento de cabeça e de mugidos elevou-se no período pós-contenção nos animais submetidos à eletroejaculação;

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Manual do inseminador**. São Paulo: Imagem Rural, 2005.

BARBERA, S.; BOSTICCO, A.; TARTAR, E. Progesterone rate in growing-finishing bulls as sign of stress. **Zootecnia e Nutricione Animale**, v.25, p.131-135, 1999.

BARTH, A. D. Evaluation of potencial breeding soundness of the bull. In: Youngquist, R.S. (ed.). **Current therapy in large animal theriogenology**. s.l.: S.W. B. Soundres company; p.222-236. 1997.

BARTH, A. D; ARTEAGA, A. A.; BRITO, L. F. C.; PALMER, C. W. Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: na alternative for eletroejaculation allowing observation of sex drive and mating hability. **Animal Reproductive Science**, v.84, p.315-325, 2004.

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v.35, p.93-102, 1994.

BARTON, B. A.; DWYER, W. P. Physiological stress effects of continuous and pulsed-DC eletroshock on juvenile bull trout. **Journal of Fish Biology**, v.51, p.998-1008, 1997.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Fisiologia. In: BERNE, R. M.; LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. (Eds). **Hipótalamo e Hipófise**. USA: s.n., p.822, 2000.

CHACÓN PÉREZ, G.; GARCÍA-BELENGUER LAITA, S.; ILLERA DEL PORTAL, J. C.; PALACIO LIESA, J. Validation of an EIA technique for the

determination of salivary cortisol in cattle. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.2, n.1, p.45-51, 2004.

CHARNET, R.; FREIRE, C. A. L.; CHARNET, E. M. R.; BONVINO, H. **Análise de modelos de regressão linear com aplicações**, 1. ed. Campinas, 1999, 370p.

COOPER, C.; EVANS, A. C.; COOK, S.; RAWLINGS, N. C. Cortisol, progesterone and β -endorfine response to stress in calves. **Canadian Journal of Animal Science**, v.95, p.197-201, 1995.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: s.n., 1997. 352p.

DOBSON, H; SMITH, R. F. What is stress, and how does it affect reproduction? **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 743-752, 2000.

DOBSON, H.; TEBBLE, J. E.; SMITH, R. F.; WARD, W. R. Is stress really that important? **Theriogenology**, v. 55, p. 65-73, 2001.

DZIUK, P. J.; GRAHAM, E. F.; PETERSON, W. E. The technique of eletroejaculation and its use in dairy bulls. **Journal Dairy Science**, v. 37, p. 1035, 1954.

EDWARDS, A. L. The Correlation Coefficient. **In: FREEMAN, W. H. (Eds). An Introduction to Linear Regression and Correlation**. 1976, p. 33-46.

ETSON, C. J.; WALDNER, C. L.; BARTH, A. D. Evaluation of a segmented rectal probe and caudal epidural anesthesia for eletroejaculation of bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 235-240, 2004.

FALK, A.; WALDNER, C. L.; COTTER, B.; GUDMUNDSON, J.; BARTH, A. D. Effects of epidural lidocaine anesthesia on bulls during eletroejaculation of bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 116-120, 2001.

FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL. Disponível em:
<<http://www.fawc.org.uk/freedoms.htm>>. Acesso:14 fev. 2007.

FISCHER, A. D.; KNIGHT, T. W.; COSGROVE, G. P.; DEATH, A. F.; ANDERSON, C. B.; DUGANZICH, D. M.; MATTHEWS, L. R. Effects of surgical or banding castration on stress responses and behaviour of bulls. **Australian Veterinary of Journal**, v. 79, n. 4, p. 279-284, 2001.

FURMAN, J. W.; BALL, L.; SEIDEL, G. E. Eletroejaculation of bulls using pulse waves of variable frequency. **Journal animal Science**, v. 40, p. 665-670, 1975.

GRANDIN, T. Assessment of stress during handling and transport. **Journal of Animal Science**, v.75, p. 249-257, 1997.

GUNN, R. M. C. Fertility in sheep. Artificial production of seminal ejaculation and the characters of the spermatozoa contained therein. **Council for Scientific and Industrial research bull**, v. 94, 1936.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in Farm Animales**. 7.ed. São Paulo, 2000, 582p.

HEIN, K. G.; ALLRICH, R. D. Influence of exogenous adrenocorticotrophic hormone on estrous behavior in cattle. **Journal Animal Science**, v.70, p.243-247, 1992.

HENNESSY, D.P.; WILLIANSON, P. The effects of stress and ACTH administration in hormones profile, oestrus and ovulation. **Theriogenology**, v. 20, p. 13-29, 1983.

HOLLENSTEIN, K.; JANETT, F.; BLEUL, U.; HASSIG, M.; KAHN, W.; THUN, R. Influence of estradiol on adrenal activity in ovariectomized cows during acute stress. **Animal Reproduction Science**, v. 11, p. 1-11, 2005.

KENNEY, J. F.; KEEPING, E. S. Linear Regression and Correlation. In: NOSTRAND, V. (Eds). *Mathematics of Statistics*, 1962, p. 252-285.

KENNY, F. J.; TARRANT, P. V. The reaction of bulls to short-haul road transport. **Applied Animal Behavior Science**, v. 17, p. 209-227, 1987.

KENT, J. E.; EWBANK, R. The effect of road transportation on the blood constituents and behavior of calves III three months old. **Brazilian Veterinary Journal**, v. 142, p. 326, 1986.

LEBELT, D.; SCHONREITER, S.; ZANELLA, A. J. Salivary cortisol in stallions: the relationship with plasma levels, daytime profile and changes in response to sêmen collection. **Peerdeheilkund**, v.12, n. 4, p.411-414, 1996.

LISLE, G. W. Eletroejaculation: a welfare issue? **Surveillance**, v. 22, p. 15-17, 1995.

MACLUSKY, N. J.; NAFTOLIN, F.; LERANTH, C. Immunocytochemical evidence for direct synaptic connections between corticotrophin-releasing factor (CRF) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) containing neurons in the preoptic area of the rat. **Brain Research**, v. 439, p. 391-395, 1988.

MAZIERO, R. R. D.; MARTINS, A. C.; MOLLO, M. R.; BASTOS, M. R.; FERREIRA, J. G. S.; SIQUEIRA FILHO, E. R.; RAMOS, A. F.; DRIESSEN, K.; COMEGNO JR, L. C.; RUMPF, R.; SARTORI, R. Efeito do estresse agudo no comportamento de estro e ovulação em vacas na fase peri-ovulatória. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 342, 2006.

MCDONALD, L. E. Veterinary endocrinology and reproduction. In: MARTIN, P. A.; CRUMP, M. H. (Eds). **The adrenal gland**. 1989a, p. 165-200.

MCDONALD, L. E. Veterinary endocrinology and reproduction. In: PINEDA, M. H. (Eds). **Male reproductive system**. 1989b, p. 239-281.

MCDONALD, L. E. Veterinary endocrinology and reproduction. In: REIMERS, T. J. (Eds). **The pituitary gland**. 1989c, p. 17-34.

MOOD, A. M; GRAYBILL, F. A.; BOES, D. Introduction to the Theory of Statistics. In: ROUSSAS, G. G. (Eds). A first Course on Mathematical Statistics. 1974, p. 14-55.

MOSURE, W. L.; MEYER, R. A.; GUDMUNDSON, J.; BARTH, A. D. Evaluation of possible methods to reduce pain associated with eletorejulation in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 39, p. 504-506, 1998.

MOUNIER, L.; VEISSIER, I.; BOISSY, A. Behavior, physiology, and performance of bulls mixed at the onset of finishing to form uniform body weight groups. **Journal Animal Science**, v. 83, p. 1696-1704, 2005.

MUNIZ, L. M. R.; OBA, E.; VULCANO, L. C.; MAMPRIM, M. J. Levels of testosterone and thyroxine obtained before and after sêmen collection from horses using artificial vagina. **Veterinária e Zootecnia**, v.9, p.79-85, 1997.

MUNKSGAARD, L.; INGVARTSEN, K. L.; PEDERSEN, L. J.; NIELSEN, V. K. M. Deprivation of lying down affects bahaviour and pituitary – adrenal axis responses in young bulls. **Acta Agriculture Scandinavica**, v. 49, p. 172-178, 1999.

NAKAO, T.; GRUNERT, E. Effects of dystocia on postpartum adrenocortical function in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 2801-2806, 1990.

NANDA, A. S.; DOBSON, H.; WARD, W. R. Relationship between an increase in plasma cortisol during transport-induced stress and failure of oestradiol to induce a luteinizing hormone surge in dairy cows. **Research Veterinary Science**, v. 49, p. 25-28, 1990.

NUNES, I. J.; BORGES, I.; MELO, M. M.; OLIVEIRA, P. R. Andrologia: primeira parte. **Cadernos técnicos de zootecnia e veterinária**, v. 35, p.1-96, 2001.

NUNES, I. J.; BORGES, I.; MELO, M. M.; OLIVEIRA, P. R. ANDROLOGIA: SEGUNDA PARTE. **Cadernos técnicos de zootecnia e veterinária**, v. 36, p.1-94, 2002.

PALMER, C. W. Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to eletroejaculation of bulls. **Theriogenology**, v. 64, p. 469-479, 2005.

PALMER, C. W.; BRITO, L. F. C.; ARTEAGA, A. A.; SÖDERQUIST, L.; PERSSON, Y.; BARTH, D. Comparison of eletroejaculation and transretal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. **Animal Reproductive Science**, v. 80, p. 25-31, 2005.

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCLIFF, K. W. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos, eqüinos**. 9. ed. São Paulo, 2000. 1737p.

RAMOS, P. **A pecuária brasileira e a problemática da aferição de seu rendimento**: uma proposta com base nos fatores de conversão. Disponível em: <<http://www.nead.org.br/index.php?acao=artigo&id=37&titulo=Artigo+do+M%C3%AAs>>. Acesso em: 14 fev. 2007.

RANDALL, D.; BURGGREN, W.; FRENCH, K. **Fisiologia animal: mecanismos e adaptações**. 4. ed. São Paulo, 2000, 870p.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biology of reproduction**, v. 45, p. 523-532, 1991.

RUIS, M. A.; GROOT, J.; BRAKE, J. H.; DINAND EKKELE, E.; VAN de BURGWAL, J. A.; ERKENS, J. H.; ENGEL, B.; BUIST, W. G.; BLOKHUIS, H. J.; KOOLHAAS, J. M. Behavioural and physiological consequences of acute social defeat in growing gilts: effects of the social environment. **Applied Animal behavior Science**, v. 70, p. 201-225, 2001.

RURALNET.Disponívelem:<<http://www.ruralnet.com.br/noticias/default.asp?noticia=214>>. Acesso em: 14 fev. 2007.

SALISBURY, G. W.; VANDERMARK, N. L.; LODGE, J. R. **Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle**. W. H. Freeman and Company; 1978.

SANDOE, P.; GIERSENG, M. H.; JEPPESEN, L. L. Concluding remarks and perspectives. **Acta Agricultural Scandandinavica (Sect. A): Animal Science**, v. 27, p. 109-115, 1996.

SAUNDERS, W. B. **Dorland's illustrated medical dictionary**. 29 ed. Saunders Company, 2000. 1304p.

SARTORI, R.; SILVA, T. A. S. N.; GUIMARÃES NETO, A. G.; MALAQUIAS, D. C. Coleta de sêmen em touros utilizando-se diferentes eletro-estimuladores. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005. **Anais...**Brasil: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2005, p. 16.

SELYE, H. Effect of adaptation to various damaging agents on the female sex organsin the rat. **Endocrinology**, v. 25, p.615-624, 1939.

SILVEIRA, I. D. B.; FISCHER, V.; SOARES, G. J. D. Relação entre genótipo e o temperamento de novilhos em pastejo e seu efeito na qualidade da carne. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 519-526, 2006.

SINGER, P. **Libertação Animal**. 1. ed. São Paulo: Lugano, 2004, 357p.

TASSONE, S.; TARTAR, E.; BARBERA, S.; CAGNASSO, A.; ABATE, O. Correlation between progesterone and cortisol in young bulls put under stress for a short period. In: BIENAL MEETING, 13, 1999, Italy. **Anais...**Italy: Associazione scientific di produzione animale (ASPA), 1999. p. 21-24.

TSUMA, V. T; EINARSSON, S.; MADEJ, A.; FORSBERG, M.; LUNDEHEIM, N. Plasma levels of progesterone and cortisol after ACTH administration in lactating primiparous sows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 39, p. 71-76, 1998.

TSUMA, V. T; EINARSSON, S.; MADEJ, A.; KINDAHL H.; LUNDEHEIN, N.; ROJKITTIKHUN, T. Endocrine changes during group housing of primiparous sows in early pregnancy. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 37, 481-489, 1996.

VITTINGHOFF, E.; SHIBOSKI, S. C.; GLIDDEN, D. V.; MCCULLOCH, C. E. **Regression Methods in Biostatistics: Linear, Logistic, Survival, and Repeated Measures Models**. 1. ed. São Paulo, 2005, 1470p.

WATTS, J. M.; STOOKEY, J. M. Vocal behavior in cattle: the animal's commentary on its biological processes and welfare. **Applied Animal Behavior Science**, v.67, p. 15-33, 2000.

WELSH, T. H.; JONHSON, B. H. Stress-induced alterations in secretion of corticosteroids, progesterone, luteinizing hormone, and testosterone in bulls. **Endocrinology**, v. 109, p. 185-190, 1981.

WILDMAN, E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E. A dairy cow body condition score system and its relationship to select production characteristics. **Journal of Dairy Science**, v. 65, p. 495-501, 1982.

WILSON, L. L.; TEROSKY, T. L.; STULL, C. L.; STRICKLIN, W. R. Effects of individual housing design and size on behavior and stress indicators of special-fed Holstein veal calves. **American Society of Animal Science**, v. 77, p. 1341-1347, 1999.

VANZIN, I. M. **Inseminação artificial e manejo reprodutivo de bovinos**.

Disponível em:< <http://www.inseminacaoartificial.com.br/>>. Acesso em: 14 fev. 2007.

YOSHIDA, C.; NAKAO, T. Response of plasma cortisol and progesterone after ACTH challenge in ovariectomized lactating dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 51, p. 99-107, 2005.

ZAR, J. H. Biostatistical analysis. 2^o ed., Engle Wood Cliffs. Prentice Hall, 1984, 718p.

Anexos

