

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

Wolff Camargo Marques Filho¹
João Carlos Pinheiro Ferreira²
Caroline Junko Fugihara²
Frederico Jorge Heitmann³
Myrna Ferraz²
Ana Livia Monteiro²
Rosirara Rosára Maziero⁴
Ian Martín⁵
Eunice Oba²

RESUMO

A pecuária bovina, uma das principais atividades agropecuárias brasileira, atingiu esse *status* graças à utilização de biotécnicas da reprodução, entre as quais se destaca a inseminação artificial (IA). Para que o sêmen possa ser processado, faz-se necessário inicialmente a sua colheita, que é realizada, principalmente, pelo emprego da vagina artificial (VA) e eletroejaculação (EEJ). Esta última vem sendo motivo de investigação pela comunidade científica devido seu impacto no bem-estar animal, baseado no emprego do conceito das cinco liberdades e nos indicadores fisiológicos endócrinos e não-endócrinos, e comportamentais de estresse. Com o objetivo de avaliar os efeitos da 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 plasmática. 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.

¹Mestrando em Medicina Veterinária FMVZ/UNESP/Botucatu, wolffcmf@yahoo.com.br

²Docente Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da UNESP/Botucatu, jcferreira@fmvz.unesp.br

³Graduando Faculdade de Matemática e Estatística da UNICAMP; ⁴Residente Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da UNESP/Botucatu; ⁵ Doutorando Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da UNESP/Botucatu.

Órgão financiador: CAPES

EVALUATION OF STRESS IN NELORE BULLS (*Bos taurus indicus*) SUBMITTED TO ELETROEJACULATION

ABSTRACT

The bovine cattle industry reached its current status mainly due to reproductive biotechniques. Artificial insemination is the most employed Brazilian biotechniques. The first step of semen processing is its collection made by artificial vagina (AV) or eletroejaculation (EEJ) procedures. Recently the eletroejaculation has been considered a welfare problem by scientific community. Five Freedoms and the physiologic and behaviour indicators are the main methods of welfare assessment. The objective this work was to evaluate the stress effects to 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 electric stimulation by EEJ device while they remained restrained. The animals of the Control group were also submitted to EEJ the ninth 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 concentrations in the second evaluation of the restrain period than those from the Control group. Electric stimulation modified the welfare behavior indicators in both groups after and during the restrain period. The respiratory frequency, heart rates, cortisol and progesterone plasmatic concentrations of the second evaluation of the restrain period were higher in the Stress group so the EEJ for five minutes should be considered a stress agent in Nelore bulls (*Bos taurus indicus*).

Key words: bull, eletroejaculate, stress, welfare animal, welfare indicators.

AVALUACIÓN DEL ESTRÉS EN TORO NELORE (*Bos taurus indicus*) SOMETIDOS A LA ELETROEYACULACION

RESUMEN

La ganadería buey, una de las principales actividades de la agricultura brasileña, alcanza ese *status* gracias a la utilización de las biotécnicas de la reproducción, entre las cuales la inseminación artificial (IA). Para que el proceso del semen, inicialmente es cosechado, por el empleo de la vagina artificial (VA) e eletroejaculación (EEJ). Esta última es motivo de la investigación por la comunidad científica gracias a su impacto en el bienestar animal, basado en el empleo del concepto de las cinco libertades e en los indicadores fisiológicos endócrinos e no-endócrinos, e comportamentales del estrés. Con el objetivo de evaluar los efectos de la EEJ sobre el estrés, 20 toros Nelore fueron divididos en grupo Control (n=10), dislocado semanalmente por nueve semanas hasta el corral para evaluación en grupo de los indicadores comportamentales de bienestar durante cinco minutos. Posteriormente, los animales fueron contenidos en el tronco para evaluación de los indicadores fisiológicos de bienestar (frecuencias respiratoria e cardíaca e temperatura anal) e colecta de sangre, permaneciendo contenidos por cinco minutos, siguiendo nuevamente evaluación de los indicadores fisiológicos e colecta de sangre para evaluar el cortisol e la progesterona plasmáticos. Después de la contención, los animales fueron liberados en otro corral para evaluación individual de los indicadores comportamentales por cinco minutos. El grupo Estrés (n=10) fue sometido a los mismos procedimientos, excepto que fue sometido semanalmente a la aplicación de estímulos eléctricos transretais por la EEJ por cinco minutos en que los animales permanecieron contenidos. El grupo Control fue sometido a la EEJ solamente en la novena semana del experimento. Durante la observación de los períodos pre e pós-

contención, los animales del grupo Estrés presentaron mayor frecuencia de abayamento de la cabeza. Este grupo presentaba también mayores frecuencias respiratória e cardíaca, e mayores concentraciones plasmáticas de cortisol e de progesterona en la segunda avaliação del período de contención. La estimulación eléctrica transretal alteró los indicadores comportamentales de los periodos pós e de contención. Las frecuencias respiratória e cardíaca, e las concentraciones plasmáticas de cortisol e de progesterona fueron mayores el la segunda avaliação del período de contención en el grupo Estrés, lo que classifica la técnica de la eletroeyaculacion como un agente desencadenador de estrés en los toros Nelore (*Bos taurus indicus*).

Palabras-clave: bienestar animal, eletroeyaculación, estrés, indicadores de bienestar, toro.

INTRODUÇÃO

O processo de industrialização do sêmen comercializado no Brasil ocorre principalmente nas Centrais de Processamento de Sêmen e Inseminação Artificial, que realizam as etapas de colheita, avaliação, congelamento, armazenamento e comercialização do sêmen congelado. (ASBIA, 2005). Para realizar a colheita de sêmen podem ser utilizados diferentes métodos, entre eles, a eletroejaculação (EEJ), a vagina artificial (VA) e a massagem transretal das glândulas sexuais acessórias (RM) (HAFEZ e HAFEZ, 2000; PALMER, 2005). Em função das vantagens e desvantagens das diversas metodologias, os dois primeiros são os mais aplicáveis, respectivamente, à realidade diária do manejo a campo e nas centrais de inseminação (BARTH, 1997; MOSURE et al., 1998).

A colheita 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 e HAFEZ, 2000; PALMER, 2005). Este método é o mais indicado para evitar alterações comportamentais e fisiológicas nos animais (BARTH et al., 2004). Contudo, a técnica mais utilizada para realizar o exame andrológico em bovinos e nos animais impossibilitados de efetuarem a monta é a EEJ (MIES FILHO, 1987). Além de desencadear a ejaculação, a EEJ causa desconforto, inquietação, aumento da frequência de vocalização (MUNIZ et al., 1997; LEBELT et al., 1996; SAUNDERS, 2000; MARQUES FILHO et al., 2007), elevação na frequência cardíaca (MOSURE et al., 1998), elevação da concentração plasmática do cortisol (FALK et al., 2001; MARQUES FILHO et al., 2007), da glicose e da progesterona (WELSH e JONHSON, 1981; FALK et al., 2001). Este conjunto de reações permite classificar a EEJ como um estímulo estressor em bovinos *Bos taurus taurus* (BARTON e DWYER, 1997).

Uma vez que o sucesso econômico de um centro de reprodução de bovinos depende, entre outros fatores, da manutenção da saúde do animal, que por sua vez está associada ao bem-estar, este artigo tem por objetivo avaliar o estresse promovido pela eletroejaculação semanal em touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), durante nove semanas consecutivas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os animais em média com 35 meses e 467 Kg de peso vivo, sem experiência prévia com eletroejaculação, foram divididos aleatoriamente em dois grupos (n=10): Controle e Estresse. Os grupos, separadamente, foram submetidos semanalmente, por nove semanas consecutivas, às avaliações e procedimentos descritos a seguir.

Os animais do grupo Controle foram conduzidos até o curral de espera, onde permaneceram por cinco minutos (período pré-contenção), para avaliação (por meio do número absoluto da expressão de cada comportamento), em grupo, da frequência em número absoluto de expressão individual dos indicadores comportamentais de bem-estar (abaixamento de cabeça, atitudes de deitar, cabeçadas, coices, defecações, exposição peniana, fugas, lambidas, micções, mugidos, salivação excessiva e moderada, vocalização) (GRANDIN, 1997; WILSON et al., 1999; WATTS e STOOKEY, 2000; DOBSON et al., 2001; RUIS et al., 2001; PALMER, 2005).

Após o período pré-contenção, os animais foram contidos no brete e foi realizada a primeira avaliação dos indicadores fisiológicos não-endócrinos e endócrinos de bem-estar: mensuração das frequências respiratória (número de movimentos respiratórios por minuto) e cardíaca (número de movimentos cardíacos por minuto), aferição da temperatura retal e coleta de amostra de sangue por

punção do plexo sanguíneo caudal para posterior dosagem plasmática de cortisol e progesterona (RIVIER et al., 1991; TASSONE et al., 1999; WILSON et al., 1999; BERNE et al., 2000; CUNNINGHAM, 2000; RANDALL, 2000; DOBSON et al., 2001; RUIS et al., 2001; PALMER, 2005; PALMER et al., 2005).

A seguir, os animais permaneceram contidos por cinco minutos sem que nenhum procedimento fosse realizado, exceto na nona semana experimental, em que foram submetidos à eletroejaculação por meio de estímulos elétricos sucessivos de corrente contínua de 12 v, 300 a 500 mA e potência de 4 W durante três segundos, intercalados por três segundos de repouso.

Durante o período de contenção foi avaliada a frequência em número de expressão dos comportamentos de deitar, de expor o pênis e de vocalizar e, após este período, foi realizada, de maneira idêntica à anterior, a segunda avaliação dos indicadores fisiológicos de bem-estar e a colheita de sangue.

Posterior ao período de contenção, os animais foram liberados em outro curral para avaliação individual dos indicadores comportamentais de bem-estar por cinco minutos.

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 semanas, foi realizada a EEJ.

As amostras de sangue, acondicionadas em tubo de ensaio de dez mL contendo anti-coagulante (heparina), permaneceram refrigeradas por duas a quatro horas em temperatura de 5°C, foram centrifugadas a 1710 x g/15 minutos e o plasma obtido foi armazenado a -20°C.

O plasma armazenado foi utilizado para a dosagem plasmática das concentrações de cortisol e de progesterona, pela técnica de radioimunoensaio, utilizando-se kits comerciais (DPC MedLab). Os coeficientes de variação intra-ensaio e a sensibilidade do ensaio foram de 5,74% e 6,68%, 0,04 ng/ml e 0,06 ng/mL, respectivamente para o cortisol e para a progesterona.

As variáveis comportamentais, organizados na forma de frequência de expressão, foram comparadas, entre os grupos ao longo das semanas experimentais, pelo Teste Exato, considerando-se a hipótese que o grupo Estresse apresentava maiores frequências. Desta mesma forma, as somatórias das frequências semanais foram também comparadas (KENNEY e 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). As variáveis fisiológicas foram representadas pela média e o erro padrão (MOOD et al., 1974). A comparação entre as médias semanais dos grupos experimentais, entre as médias da primeira e segunda avaliação e entre as médias gerais de cada grupo experimental foi realizada pelo 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). O nível de significância para todos os testes realizados foi de 95% ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Durante o período de contenção não houve diferença entre os grupos experimentais em relação as variáveis comportamentais, exceto para a frequência de abaixamento de cabeça, que foi maior no grupo Estresse na primeira, terceira, quarta, oitava e na somatória das frequências das semanas (Figura 1). Esta variável teve sua frequência progressivamente aumentada, nos dois grupos, ao longo das semanas.

Os indicadores fisiológicos não-endócrinos e endócrinos da primeira avaliação do período de contenção não diferiram entre os grupos experimentais em nenhuma das semanas.

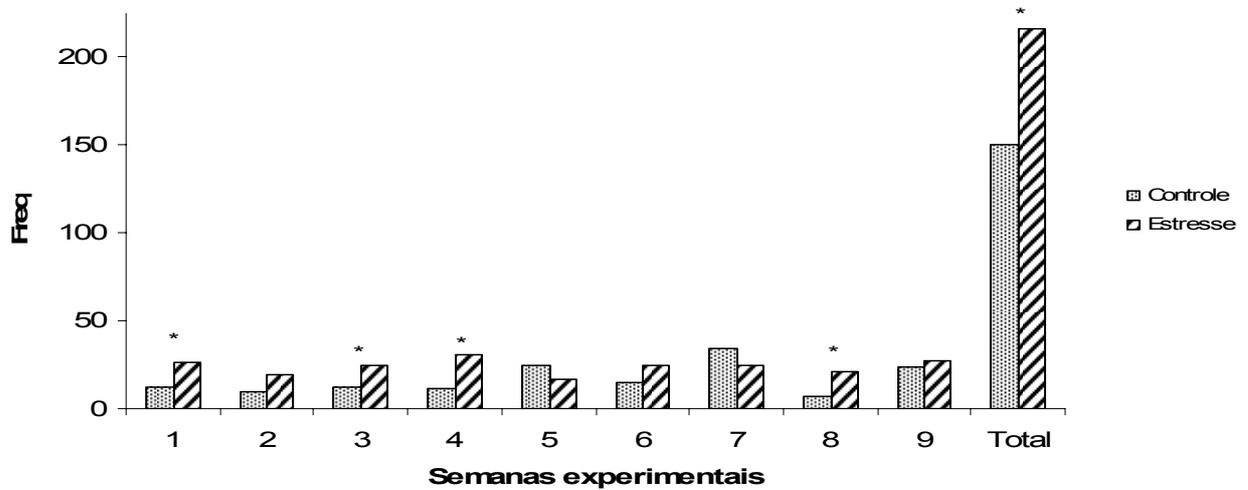
Durante o período de contenção, os animais do grupo Estresse apresentaram maiores frequências de vocalização (sexta, sétima e no total das semanas) (Figura 2) e de atitudes de deitar (nona e no total das semanas) (Figura 3).

Durante a segunda avaliação do período de contenção, os animais do grupo Estresse apresentaram maiores médias gerais das frequências respiratória (Figura 4) e cardíaca.

As concentrações plasmáticas de cortisol e da progesterona do grupo Estresse da segunda avaliação do período de contenção foram maiores que as verificadas na primeira avaliação exceto, na segunda, terceira e somatória das semanas, para o cortisol (Figura 5), e na primeira, quinta e sexta semanas para a progesterona (Figura 6), nas quais foram iguais.

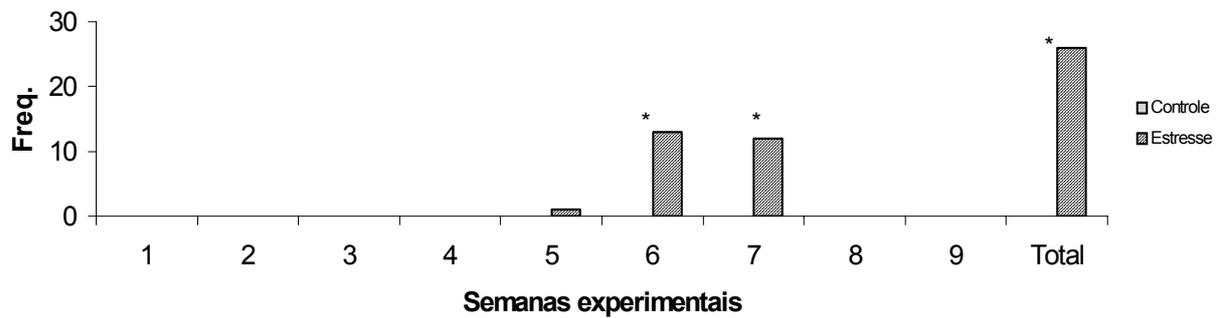
Os indicadores comportamentais avaliados no período pós-contenção não diferiram entre os

grupos experimentais, exceto para a frequência de abaixamento de cabeça (1, 2, 5, 7 e total de semanas), de salivação excessiva (total das semanas) e de mugidos (2, 4, 5, 6 e total das semanas), que foram superiores nos grupo Estresse.



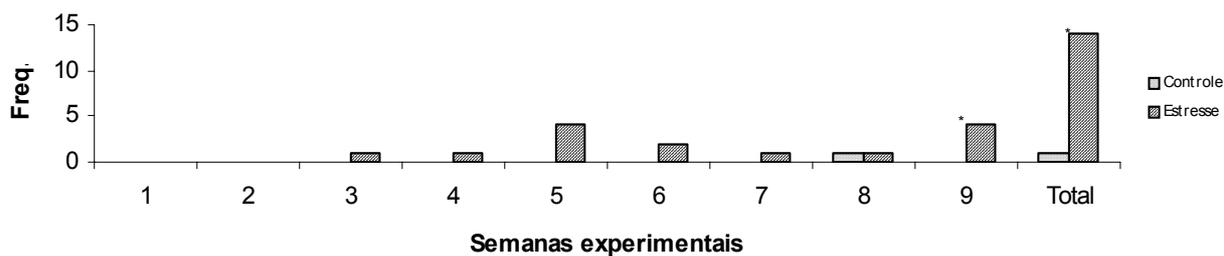
* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,02$)

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



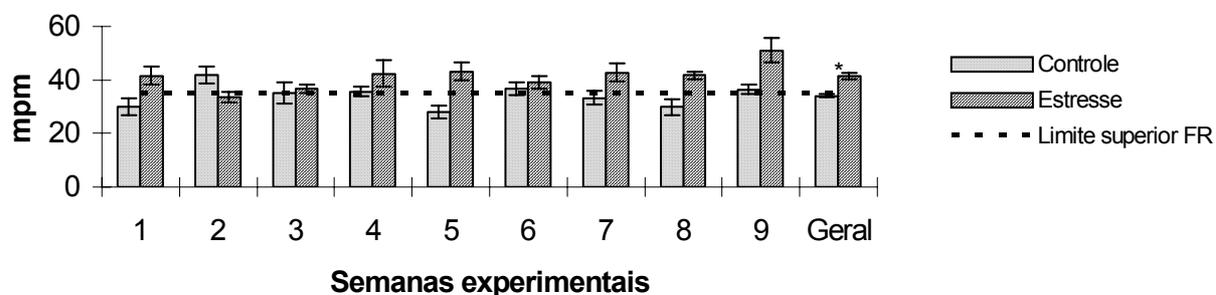
* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,01$)

FIGURA 2. Frequência de vocalizações dos animais dos grupos Controle e Estresse no período de contenção nas semanas experimentais.



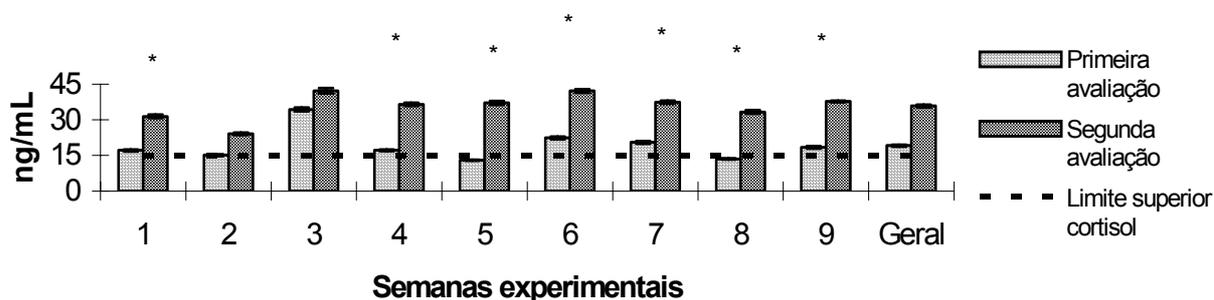
* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,01$)

FIGURA 3. Frequência de atitudes de deitar dos animais dos grupos Controle e Estresse no período de contenção nas semanas experimentais.



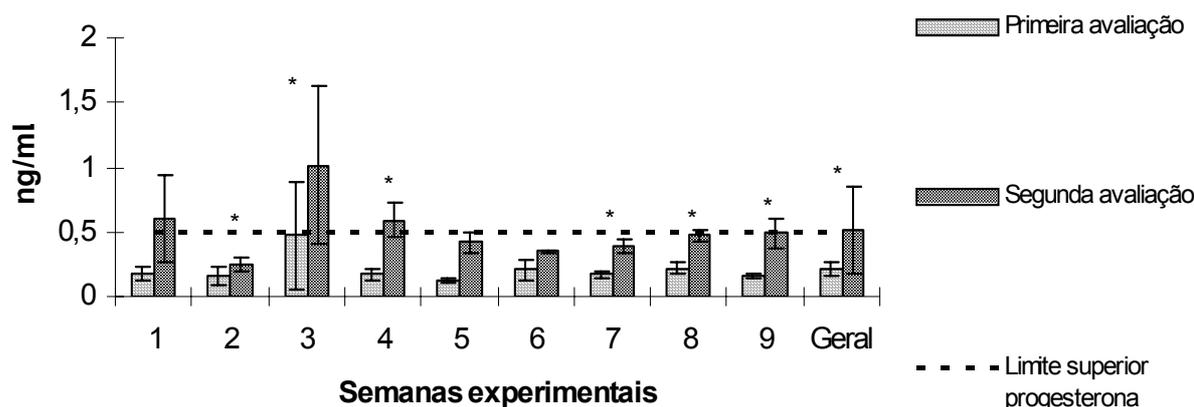
* indicam diferença significativa entre os grupos experimentais ($p \leq 0,05$)

FIGURA 4. 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 ($p \leq 0,05$)

FIGURA 5. 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 ($p \leq 0,05$)

FIGURA 6. 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

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 conseqüências 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 para *Bos taurus indicus*.

Está hipótese 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 (Figura 1). 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”.

As elevações das frequências respiratória (FURMAN et al., 1975, RADOSTITIS, 2000) e cardíaca (KENNY e TARRANT, 1987; MOSURE et al., 1998, PALMER et al., 2005) e da temperatura retal (KENNY e TARRANT, 1987; MCDONALD, 1989, 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 na maioria das avaliações 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.

A semelhança dos indicadores fisiológicos não endócrinos aferidos na primeira avaliação do período de contenção, de maneira geral os indicadores endócrinos durante este período também não foram influenciados pela estimulação elétrica transretal da(s) semana(s) anterior(es). 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.

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 destas 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 Eton 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 (figura 2) e de atitudes de deitar (figura 3) 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.

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 (Figura 4). Contudo, o grupo Estresse apresentou maiores valores médios gerais para as frequências respiratória e cardíaca. Este fato sugere que EEJ foi um procedimento estressante.

Os resultados 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 comparadas as concentrações plasmáticas de cortisol da primeira e da segunda avaliação 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 (Figura 5), 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 (Figura 6), 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), Eton 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.

Estes resultados reforçam os 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.

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais em que foi realizado este estudo, os resultados obtidos permitem concluir que a eletroejaculação pode ser classificada como um agente desencadeador de estresse em touros Nelore (*Bos taurus indicus*).

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo fornecimento de bolsa de estudo.
Aos funcionários da Fazenda Experimental São Manoel, João Ratti Júnior e Ivo Donizeti Ferreira de Brito.

REFERÊNCIAS

- ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **Manual do inseminador**. São Paulo: Imagem Rural, 2005.
- 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.
- 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). **Hipotálamo e Hipófise**. USA: s.n., p.822, 2000.
- 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.
- 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.

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 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.

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

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.

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.

MARQUES FILHO, W. C.; FERREIRA, J. C. P.; FIJIHARA, C. J.; FERRAZ, M. C.; MONTEIRO, A. L. R.; HEITMANN, F. J. Avaliação do bem-estar e qualidade do sêmen de touros submetidos à eletroejaculação. **In: XXI REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES**. 2007. Brasil. **Anais...Brasil: SBTE 2007**.

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

MIES FILHO, A. Reprodução dos Animais Domésticos e Inseminação Artificial. 6^a ed. Porto Alegre: Sulina, v. 2, p. 339-367, 1987.

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 eletroejaculation 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.

PALMER, C. W. Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to electroejaculation 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 electroejaculation 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.
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 EKKEL, E.; VAN de BURG WAL, 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.

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

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 scientifica di produzione animale (ASPA)**, 1999. p. 21-24.

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.

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.

Recebido em: 20/12/2007

Aceito em: 16/06/2008