

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**BEM-ESTAR E TAXA DE PREENHIZ DE OVELHAS
SUBMETIDAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
TRANSCERVICAL SOB ANESTESIA SUBARACNÓIDEA**

*WELFARE AND PREGNANCY RATE OF EWES TRANSCERVICALLY
INSEMINATED UNDER SUBARACHNOID ANESTESIA*

Renata Padovan Barboza Carneiro

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
NOVEMBRO/2011

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**BEM-ESTAR E TAXA DE PRENHEZ DE OVELHAS
SUBMETIDAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
TRANSCERVICAL SOB ANESTESIA SUBARACNÓIDEA**

Renata Padovan Barboza Carneiro

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL
2011

Ao meu Pai, à minha Mãe
e principalmente ao meu
querido Avô (*in memoriam*).

Dedico.

SUMÁRIO

“Páginas”

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Bem-estar e a produção animal	10
2.1.1 Avaliação do bem-estar animal.....	11
2.2 Dor nos animais de produção	13
2.2.1 Produção animal e a dor.....	14
2.2.2 Dor e a função reprodutiva.....	15
2.2.3 Avaliação da dor.....	15
2.2.4 Controle da dor.....	17
2.3 Inseminação artificial em ovinos	19
2.3.1 Anatomia da cérvix da ovelha.....	19
2.3.2 Técnicas de inseminação artificial.....	22
2.3.2.1 Inseminação artificial transcervical.....	24
3 REFERÊNCIAS	26

CAPÍTULO II - BEM-ESTAR E TAXA DE PREENHEZ DE OVELHAS SUBMETIDAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL SOB ANESTESIA SUBARACNOÍDEA

Resumo.....	32
Abstract.....	33
1. Introdução.....	34
2. Material e Métodos.....	35
2.1 Análise estatística.....	39
3. Resultados e Discussão.....	40
4. Conclusão.....	50
5. Referências Bibliográficas.....	50

LISTA DE TABELAS

“Páginas”

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Tabela 1. Taxas de prenhez de ovelhas, de acordo com o método de inseminação artificial e o tipo de sêmen utilizado.....	23
--	----

CAPÍTULO II - BEM-ESTAR E TAXA DE PREENHEZ DE OVELHAS SUBMETIDAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL SOB ANESTESIA SUBARACNÓIDEA

Tabela 1. Valores médios para FC, FR e Tpele, obtidos em diferentes momentos (basal, após contenção, após tração cervical e pós IA) do processo de IA transcervical, de ovelhas Sulffolk adultas, de acordo com o tratamento: inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE); inseminação artificial transcervical sob anestesia subaracnóidea com quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75).....	42
Tabela 2. Frequência média de posições das orelhas observadas após os procedimentos de IA em ovelhas Suffolk adultas submetidas à inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE); inseminação artificial transcervical sob anestesia subaracnóidea com quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75).....	46

LISTA DE FIGURAS

“Páginas”

CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS

- Figura 1. Cérvix ovina aberta, demonstrando os anéis cervicais, suas reentrâncias e o aplicador transpondo-os (peça de abatedouro)..... 21
- Figura 2. Classificação anatômica do orifício cervical externo segundo HALBERT *et al.* (1990)..... 21
- Figura 3. Esquema representativo do local de deposição do sêmen e suas respectivas denominações das técnicas de inseminação artificial em ovinos..... 23
- Figura 4. Passagem do aplicador pela cérvix da ovelha, utilizando duas pinças *Pozzi* e o aplicador expansor transcervical..... 24

CAPÍTULO II - BEM-ESTAR E TAXA DE PREENHEZ DE OVELHAS SUBMETIDAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL SOB ANESTESIA SUBARACNÓIDEA

- Figura 1. Diferença dos níveis séricos de cortisol (Δ Cort) entre momentos, ANTES IA e APÓS IA, de acordo com a taxa de prenhez, em ovelhas Suffolk adultas submetidas à inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE), com anestesia subaracnóidea utilizando quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75)..... 44
- Figura 2. Ocorrência (%) dos comportamentos de contração abdominal (contraí com tenesmo, contraí, contraí pouco e sem contração) e tração de cérvix (traciona até metade da vagina e traciona até a vulva), em ovelhas Suffolk adultas submetidas à inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE), com anestesia subaracnóidea utilizando quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75)..... 45
- Figura 3. Dispersão de frequência de vocalização (berro, gemido e sem vocalização) de ovelhas Suffolk adultas durante os subprocessos envolvidos na inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE); inseminação artificial transcervical sob anestesia subaracnóidea com quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75)..... 46
- Figura 4. Ocorrência dos tipos de postura (em pé, deitada ou ajoelhada) em ovelhas Suffolk adultas durante 90 minutos (frações de 10 minutos - 1 ao 9) após o procedimento de inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE); inseminação artificial transcervical sob anestesia subaracnóidea 47

com quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75).....

Figura 5. Taxa de prenhez (TP) de ovelhas Suffolk adultas submetidas à inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE); inseminação artificial transcervical sob anestesia subaracnóidea com quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75)..... 49

Figur 6. Dispersão dos escores de contração abdominal (contraí com tenesmo, contraí, contraí pouco e sem contração) de acordo com a prenhez (P: prenhe, NP: não prenhe), de ovelhas submetidas à inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE); inseminação artificial transcervical sob anestesia subaracnóidea com quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75)..... 50

1 INTRODUÇÃO

A demanda de carne nos países em desenvolvimento vem sendo impulsionada pelo crescimento demográfico, pela urbanização e pelas variações das preferências e dos hábitos alimentares dos consumidores (FAO, 2007). A população brasileira, segundo IBGE (2010), está estimada em torno de 190 milhões de habitantes e, levando-se em consideração que o consumo médio anual de carne ovina *per capita* é de 700 g (MAPA, 2011), para suprir a demanda seria necessária uma produção de aproximadamente 129.500 ton/ano. A disponibilidade de carne de cordeiros no Brasil não ultrapassa 78.000 ton/ano, mesmo se somada às 5.650 toneladas importadas principalmente do Uruguai (SÓRIO, 2009). Esse cálculo gera um déficit de produção em torno de 45.850 ton/ano e demonstra-nos que a demanda é maior que a oferta, portanto as tendências para o mercado ovino são promissoras.

A produção de carne tornou-se o principal objetivo da ovinocultura. Os preços pagos ao produtor elevaram-se na última década, tornando a atividade atraente e rentável. O estímulo para a maior produção de cordeiros resultou no aumento do número de animais abatidos no Brasil, o que criou uma demanda de melhoria dos índices de produtividade (VIANA, 2008). Isso tem levado criadores e técnicos a ampliarem a utilização de algumas biotécnicas da reprodução, com o objetivo de aumentar a utilização de patrimônio genético de alto valor zootécnico. A inseminação artificial (IA) é a tecnologia mais utilizada, embora tenha limitações na espécie ovina, tem sido objeto de pesquisa aplicada na busca de soluções.

O procedimento de IA em ovelhas com sêmen congelado tem sido realizado por dois métodos: o transcervical e o laparoscópico (HAFEZ e HAFEZ, 2004). A via laparoscópica apresenta melhores resultados, por permitir a deposição intrauterina do sêmen; no entanto, trata-se de um procedimento cirúrgico, que exige equipamentos caros. Ao se optar pela IA transcervical há o entrave do tamanho e forma do óstio externo e do canal cervical, que representam uma grande barreira para este método (KERSHAW *et al.*, 2005; ANEL *et al.*, 2006), assim como para a transferência de embriões (BUNCH e ELLSWORTH, 1981). Essa dificuldade aumenta os erros de deposição seminal intrauterina e é uma das razões do uso limitado da IA com sêmen congelado, além dos baixos resultados obtidos.

A IA transcervical com tração requer grande manipulação de vagina e cérvix em ovelhas e isso pode promover estresse agudo, manifestado em forma de dor, podendo causar trauma significativo para a genitália interna e, interferir na taxa de fertilidade (DEROSSI *et al.*, 2009). Quando um animal sente dor ocorre liberação de opióides endógenos que inibem a secreção de GnRH, logo ocorre bloqueio na secreção de LH, conseqüentemente, atrasando ou bloqueando a ovulação (BREEN *et al.*, 2005), podendo ser prejudicial para a fertilidade.

Atualmente, a adoção de quaisquer procedimentos de manejo com vistas à melhoria da produtividade devem ser acompanhados de uma preocupação com a garantia de respeito ao animal e ao bom bem-estar. Numa época em que a responsabilidade do ser humano no uso dos animais, seja para fins produtivos ou não, tem sido cobrada mundialmente e provocado mudanças na adoção de técnicas de manejo para melhorar o bem-estar animal, não cabe a adoção de práticas que provoquem dor, principalmente nos casos em que há estratégias para evitá-la. Ademais, a diminuição do estresse durante um procedimento, como a IA, pode trazer benefícios fisiológicos que resultem em melhor fertilidade.

Diante do exposto, pretendeu-se verificar se o uso de anestesia subaracnóidea, durante os procedimentos de inseminação artificial transcervical com tração em ovinos, melhora o bem-estar animal e a taxa de prenhez.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bem-Estar e a Produção Animal

O bem-estar de um indivíduo é definido como o seu estado em relação às tentativas de adaptar-se ao ambiente (BROOM, 1986). Essa definição mostra que bem-estar animal refere-se a uma característica individual do animal, e não a algo proporcionado ao animal pelo homem (BROOM e JOHNSON, 1993). A base deste conceito é quão bem o indivíduo está enfrentando um determinado estímulo, o que pode ser classificado em uma escala variando de muito bom a muito ruim, avaliado cientificamente a partir do estado biológico do animal e de suas preferências, ou seja, trata-se de um estado mensurável (BROOM e MOLENTO, 2004).

Níveis séricos de cortisol e percentual de tempo gasto em comportamentos estereotípicos são exemplos de variáveis medidas.

Os efeitos sobre o bem-estar incluem aqueles provenientes de doença, traumatismos, fome, estimulação benéfica, interações sociais, condições de alojamento, tratamento inadequado, manejo, transporte, procedimentos laboratoriais, mutilações variadas, tratamento veterinário ou alterações genéticas através de seleção genética convencional ou por engenharia genética (BROOM e MOLENTO, 2004). A dificuldade prolongada em se obter sucesso ao enfrentar dada situação estressante pode resultar em queda no crescimento, na reprodução e até em morte.

Duncan (1993) defende que o bem-estar é reduzido quando os animais têm sentimentos negativos, ou seja, sofrem, e inclui entre estes sentimentos frustração, medo, dor, solidão, aborrecimento e, talvez, até sentimentos que não ocorrem em seres humanos. Do ponto de vista da discussão sobre bem-estar animal, não importa se frustração, medo e dor em animais são semelhantes às mesmas sensações em humanos, mas quão negativas o são do ponto de vista do animal.

Alguns dos principais fatores que podem influenciar o bem-estar na criação de animais de produção estão relacionados às práticas de manejo nos sistemas intensivos (HÖTZEL e MACHADO FILHO, 2004). A alta produtividade não é sinônimo de bem-estar (BROOM, 1991), mas quando o bem-estar é pobre, pode haver queda na produção de ovos e leite, na reprodução e no crescimento, aumento da incidência de doenças e produção de carne de qualidade inferior. Por exemplo, o estresse social devido a manejos inadequados na propriedade pode influenciar negativamente a qualidade da carne, o ganho de peso e a reprodução (BROOM e MOLENTO, 2004). Além disso, pode haver aumento nos custos de produção e/ou prejuízos na qualidade final do produto.

2.1.1 Avaliação do bem-estar animal

Produtividade, sucesso reprodutivo, taxa de mortalidade, comportamentos anômalos, severidade de danos físicos, atividade adrenal, grau de imunossupressão ou incidência de doenças são fatores que podem ser medidos para avaliar o grau de bem-estar dos animais (BROOM, 1991). Existem duas correntes principais na forma de avaliar o bem-estar de animais criados em sistemas intensivos. A primeira considera principalmente o estado

biológico dos animais em uma dada situação, enquanto a segunda considera principalmente as suas experiências subjetivas (MENDL, 2001).

Alguns sinais de bem-estar são evidenciados por mensurações fisiológicas. Por exemplo, aumento de frequência cardíaca, atividade adrenal, atividade adrenal após desafio com hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) ou resposta imunológica reduzida após um desafio podem indicar que o bem-estar está mais reduzido que em indivíduos que não mostrem tais alterações (BROOM e MOLENTO, 2004).

Pritchett *et al.* (2003) realizaram experimento com cavalos comparando três tratamentos: controle, anestesia e cirurgia. No tratamento cirurgia, incluíram-se animais em situação clínica de emergência em que havia indicação de laparotomia exploratória de urgência e nos quais não se adotou nenhum método para o alívio da dor. Concluíram que locomoção reduzida, elevada concentração de cortisol plasmático e frequência cardíaca elevada variaram significativamente nos animais que sofreram dor ($P < 0,05$) e que seriam indicadores potenciais da dor pós-operatória.

Nesse tipo de avaliação se enquadra o cortisol, que é o esteróide em circulação mais abundante e o principal glicocorticóide secretado pelo córtex-adrenal. Fisiologicamente eficaz na atividade antiinflamatória e na homeostase, o cortisol está igualmente envolvido na gliconeogênese, na absorção do cálcio e na secreção de ácido gástrico e pepsina (CARLSON, 2002). Como indicador da função cortico-adrenal, a medição dos níveis de cortisol no sangue é útil na detecção de qualquer tipo de estresse que o organismo tenha sofrido, na maioria dos mamíferos (BRISTOW e HOLMES, 2007). Uma grande variedade de testes de estimulação e supressão (estimulação de ACTH, reserva de ACTH, supressão de dexametasona) pode fornecer informações de apoio sobre essa função (CARLSON, 2002).

Mensurações do comportamento são muito utilizadas na avaliação do bem-estar por serem práticas e não invasivas. O fato de um animal evitar ou esquivar-se fortemente de um objeto ou evento fornece informações sobre seus sentimentos e, em consequência, sobre seu bem-estar. Quanto mais forte a reação de esquiva, mais pobre será o bem-estar durante a presença do objeto ou do fato. Um indivíduo que se encontra impossibilitado de adotar uma postura preferida de repouso, apesar de repetidas tentativas, será considerado como tendo um bem-estar mais pobre que outro cuja situação permite a adoção da postura preferida. Comportamentos anormais, tais como estereotípias, automutilação, canibalismo em suínos, bicar de penas em aves ou comportamento excessivamente agressivo indicam que o indivíduo

em questão encontra-se em condições de baixo grau de bem-estar (BROOM e MOLENTO, 2004). Algumas medidas são mais relevantes de ser utilizadas em situações de estresse de curto prazo, tais como aquelas associadas ao manejo ou a um período breve de condições físicas adversas, enquanto outras são mais apropriadas para detectar respostas advindas de estímulos de longo prazo.

2.2 Dor nos animais de produção

Através do tempo a dor em animais tem sido motivo de discussão. Antigamente se pensava que os sistemas biológicos de animais eram menos evoluídos do que nos seres humanos e que, por consequência, o nível de dor também era menor ou não a sentiam. Desde o homem primitivo até a Grécia de Hipócrates, várias lendas tentavam dar significado à dor, desde acreditar que a dor era causada por demônios, até dizer que era uma perturbação do equilíbrio normal do organismo. Foi Aristóteles o primeiro a propor que a dor era uma alteração do calor vital do coração que, por sua vez, estava coordenado pelo cérebro, e começou a supor que a dor podia ser parte de um sistema nervoso. Em 1965, Melzack e Wall descreveram as vias nervosas da dor e estabeleceram o envolvimento dos componentes do sistema nervoso central (SNC) e periférico (BORJA, 2008).

A experimentação e procedimentos cirúrgicos eram realizados sem anestesia e a recuperação feita sem analgesia; isto levava a muitas mortes e “sem saber” à crueldade. Existia uma crença de que o sistema nervoso em neonatos não estava completamente desenvolvido e que a dor não era “consciente”; com isso, durante a década de 70 e começo da de 80, os neonatos humanos eram submetidos a procedimentos cirúrgicos de pequeno porte sem qualquer forma de alívio da dor. Do mesmo modo, Hellebrekers (2002) descreve que, até pouco tempo, as cirurgias de orquiectomia em animais jovens e caudectomias eram realizadas sem anestesia ou analgesia. Infelizmente, no Brasil, ainda se realizam esses procedimentos sem qualquer tipo de alívio da dor, apesar de haver uma Resolução (Nº 877, de 15 de fevereiro de 2008) do Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV, proibindo a adoção desta conduta por parte dos médicos veterinários. Afortunadamente, essas posturas vêm se modificando pelas mudanças nos conceitos éticos e preocupação com o bem-estar animal, muito mais em consequência da legislação, mas também por pressão da sociedade.

A dor foi conceituada pela primeira vez em 1986, pela Associação Internacional para o Estudo da Dor, como uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada a lesões reais ou potenciais.

Como a dor é um processo complexo, altera vários processos biológicos prejudicando o desenvolvimento, a reprodução e, por consequência, as respostas produtivas desejadas num sistema de criação. Desta forma, não só por questões éticas, mas pelos prejuízos que ela causa num sistema de produção, a dor tem sido objeto de estudo intenso.

2.2.1 Produção Animal e a Dor

Os sentimentos subjetivos de um animal constituem uma parte extremamente importante de seu bem-estar (BROOM e JOHNSON, 1993), ou seja, se o animal sente dor seu bem-estar está prejudicado e, conseqüentemente, haverá dano ou queda na sua produção, quer seja de leite, carne, ovos, lã, esporte, entre outras.

Dor em curto prazo aumenta temporariamente a função imunológica (GRIESEN *et al.*, 1999), entretanto, quando em curso (crônica), pode ter conseqüências negativas para a produtividade animal. Nos animais de produção, especialmente a dor crônica, pode afetar negativamente o crescimento e a função imune. Respostas inflamatórias associadas com lesão e dor têm impacto direto sobre o consumo de ração. Reduções do consumo de ração e do peso corporal têm sido observadas em animais de criação após procedimentos dolorosos (FISHER *et al.*, 1996). Mesmo depois de tratados, animais com problemas clínicos que levam à claudicação, podem apresentar alterações na percepção da dor, aumentando a sensibilidade aos estímulos nocivos cuja situação denominam hiperalgesia, que afeta negativamente a produção de leite e fertilidade em longo prazo. A dor crônica é imunossupressora: aumenta a secreção de cortisol afetando as células do sistema imunitário, reduzindo-as em número e, portanto, a sua função.

Práticas no manejo de produção, que danificam os tecidos, também causam dor (MELLOR *et al.*, 1991) e diferentes métodos de manejo na produção animal podem produzir distintas expressões da resposta à dor (SHUTT *et al.*, 1988 citados por GRANT, 2004).

2.2.2 Dor e a função reprodutiva

Os efeitos do estresse prolongado sobre a reprodução são mediados por alguns hormônios dentre os quais se destacam o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH), o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), os opióides endógenos e o cortisol (CARLSON, 2002).

O CRH é o primeiro hormônio liberado pelo hipotálamo como resposta a um estímulo estressor (por exemplo: dor), e pode interferir na função reprodutiva por estimular a produção de β -endorfinas e ACTH. As β -endorfinas, juntamente com as encefalinas, possuem propriedades opióides (SPINOSA *et al.*, 2002), apresentando importante papel na redução das emoções negativas e da dor (VARLEY e STEDMAN, 1994). Atuam nos processos reprodutivos inibindo a secreção de GnRH, por ação direta nos neurônios produtores deste hormônio, além de atuar na adenohipófise inibindo a secreção de LH (CHATTERTON, 1990). Além disso, o CRH pode ativar o sistema noradrenérgico que atua sobre os neurônios produtores de GnRH, inibindo sua secreção (CARLSON, 2002). O ACTH, por outro lado, suprime a capacidade de resposta da hipófise ao GnRH, e pode diminuir a secreção deste hormônio, através da liberação de glicocorticóides (VARLEY e STEDMAN, 1994).

Os glicocorticóides, como o cortisol, atuam diretamente sobre o hipotálamo diminuindo a secreção de GnRH e reduzindo o número de receptores deste na hipófise (CARLSON, 2002). Também suprimem o desenvolvimento folicular por causarem distúrbios na diferenciação das células da granulosa (diminuindo a expressão dos receptores para o LH), além de diminuir a secreção de estrógenos por inibição da atividade da aromatase (SMITH e DOBSON, 2002). A falta de estrógeno atrasa ou bloqueia a onda pré-ovulatória de LH, comprometendo a ovulação (BREEN *et al.*, 2005).

A secreção inadequada de LH compromete o processo ovulatório e a luteinização dos folículos. Em alguns casos, mesmo que a dinâmica folicular ocorra, a integridade das células da granulosa e do próprio ovócito ficará comprometida, e ainda que ocorra a fecundação, dificilmente esta gestação virá a termo (SMITH e DOBSON, 2002; BREEN *et al.*, 2005).

2.2.3 Avaliação da Dor

Três categorias principais de comportamentos podem ser úteis na avaliação da dor. Os comportamentos específicos de dor são os eventos mais óbvios: se contorcer, que acontece

com ratos após cirurgia abdominal, ou o aumento do número de vocalizações de alta frequência produzidas por leitões durante a castração. Carrol (2002) relata que a manifestação corporal de dor mais reconhecida nos animais é a vocalização, que pode ser expressa por choro, uivo, latido, rosnado ou gemido. Alterações na postura ou na expressão facial, proteção de um membro, automutilação, midríase, sialorréia, enrijecimento ou fraqueza musculares, alterações nos padrões de sono, ingestão ou excreção, também sugerem dor. Outros sinais incluem comportamento atípico como anorexia e agressividade (QUANDT *et al.*, 2005).

Comportamentos defensivos por vezes podem também ser vistos quando o animal ou o local da lesão é manipulado, como em cordeiros que pulam/pinoteiam à palpação do escroto após a castração. A lesão aumenta a sensibilidade do animal a outros patamares de dor, desta forma, a hiperalgesia é avaliada quando se expõe os animais a um estímulo doloroso (por exemplo, calor ou pressão) e mede-se a resposta à retirada do mesmo. O local, a intensidade e a duração da dor são avaliados pela gravidade dessas respostas e pelos tipos de comportamento que são observados. Por exemplo, cordeiros respondem ao procedimento de caudectomia, com uso de anéis de borracha (dor crônica), executando posturas anormais significativas e exibição de comportamento ativo de dor, no entanto, quando o procedimento é feito utilizando ferro quente (dor aguda) esses animais apresentam pequeno aumento não significativo nos comportamentos de dor ativa e posturas anormais (GRANT, 2004). Esse estudo comprova o relato de Shutt *et al.* (1988) de que a utilização de anéis de borracha resulta na dor isquêmica e no aumento de comportamentos e posturas anormais.

A segunda classe de resposta à dor é o declínio na frequência ou magnitude de certos comportamentos. Letargia geral tem sido considerada como um sinal de dor possível em animais e, estudos da dor, muitas vezes incluem medidas de atividades reduzidas, tais como reatividade ou latência. Comportamentos que os animais, de outra forma, seriam altamente motivados para executar, são particularmente indicativos de dor (WEARY *et al.*, 2006).

Uma terceira classe de comportamentos que expressam a dor pode ser avaliada pelos testes de preferência. Essa metodologia foi a primeira a ser utilizada na pesquisa de bem-estar animal. Os testes de preferência avaliam como os animais percebem o valor relativo ou a aversão aos diferentes tratamentos. Através de exposições repetidas às alternativas, os animais podem aprender o que esperar e o que evitar, isso tem sido utilizado para avaliar as respostas dos animais aos tratamentos potencialmente dolorosos. Por exemplo, Rushen (1986) utilizou essa abordagem para avaliar como ovelhas respondem à eletro-imobilização, um procedimento usado para conter temporariamente os animais durante a tosquia. Neste estudo,

os ovinos eram movidos ao longo de uma pista para uma área onde foram tosquiados, com e sem eletro-imobilização. Durante os ensaios repetidos, os ovinos que haviam sido eletro-imobilizados, aprenderam a esperar e ficou mais difícil de movê-los ao longo da pista do que aqueles que não receberam choque, indicando que este procedimento é aversivo.

As três abordagens têm seus méritos e podem ser úteis em diferentes contextos. Medidas de produtividade básica, tais como alterações na ingestão alimentar, muitas vezes são mais fáceis de registrar, pelo menos para os animais alojados individualmente. No entanto, estas medidas não refletem o que está acontecendo com o animal no exato momento, mas sim o que estava acontecendo durante o intervalo entre as observações (geralmente horas para consumo de alimentos e água, e dias para alterações no peso corporal).

2.2.4 Controle da Dor

O controle da dor pode incluir medicamentos, cirurgia, tratamentos alternativos (como fisioterapia, acupuntura e/ou homeopatia) ou uma combinação desses procedimentos. O objetivo é bloquear a geração, transmissão, percepção e apreciação dos estímulos nociceptivos, o que pode ser feito em diferentes níveis do sistema nervoso central e periférico (CHAVES e PIMENTA, 2003). No entanto, antes de se lançar mão destes tratamentos existe o próprio controle endógeno da dor, o qual é feito por dois mecanismos básicos de modulação: modulação segmentar da dor e modulação descendente da dor. Estes mecanismos interagem para suprimir a transferência da informação sobre dor no nível espinal. O último mecanismo age liberando morfina e encefalinas, que por sua vez liberam serotonina, provocando analgesia (KAMERLING, 2006). Segundo este autor, é evidente que os sistemas descendentes ajudam os animais a lidar com a dor e o estresse.

Os conceitos demonstram que a melhor forma de controle da dor é a prevenção. O termo analgesia preventiva refere-se à aplicação de técnicas analgésicas antes do paciente ficar exposto aos estímulos nocivos como, por exemplo, numa intervenção cirúrgica (GREENE, 2004). Desta forma, quando se realizam procedimentos dolorosos em animais, como o que parece ser a tração cervical na inseminação artificial em ovelhas, deve-se lançar mão do uso de analgesia preventiva, tendo-se como uma das alternativas, a anestesia subaracnoidea.

É consenso atual, inclusive do Colégio Americano de Anestesiologistas Veterinários (1998) e do CFMV (Resolução nº 877 de 15 de fevereiro de 2008), que a dor deve ser prevenida e aliviada, que a diminuição do sofrimento animal deve ser sempre uma meta para o médico veterinário. Além da consideração ética da supressão da dor, são comprovados os benefícios do uso dos analgésicos reduzindo o estresse emocional, a liberação de substâncias deletérias para o organismo e, portanto, melhorando a recuperação do animal, reduzindo a morbidade e a mortalidade (ANDRADE, 2002).

Para a intervenção farmacológica dispõe-se de analgésicos de ação periférica e central, e também, de anestésicos para uso em bloqueios peridurais e periféricos, com o uso de opióides, anti-inflamatórios, anestésicos locais, sedativos e anestésicos gerais (CODA, 2009).

O trauma tecidual pode induzir sensibilização central devido à anestesia insuficiente ou à estimulação contínua, gerada pela resposta inflamatória no período pós-operatório. A analgesia preventiva pode evitar a sensibilização do SNC, embora não elimine totalmente a dor pós-operatória decorrente do trauma cirúrgico (WATERMAN-PEARSON, 1997).

A anestesia epidural é indicada para procedimentos cirúrgicos nos membros pélvicos, coxal, região anal, perineal e caudal (SKARDA, 1996; RAUSER, 2005), cirurgias retro-umbilicais como cesariana, ovário-histerectomia, redução de prolapsos, caudectomia, orquiectomia e osteossíntese em membros pélvicos (CODA, 2009).

Com relação à anestesia epidural, um ponto importante diz respeito ao volume de solução a ser injetado no espaço epidural. Sabe-se que a administração de grandes volumes, quando se empregam substâncias hidrofílicas como a morfina, não é benéfica, pois aumenta a possibilidade de difusão cranial do opióide, podendo induzir depressão respiratória tardia (CODA, 2009).

Estudos clínicos demonstraram que a quetamina por via epidural, em baixas doses, pode modular a transmissão da informação nociceptiva, produzindo analgesia (GEBHARDT, 1994). A quetamina por essa via não induz depressão respiratória ou outros efeitos colaterais (ISLAS *et al.*, 1985), previne o desenvolvimento da hiperalgesia térmica (WELSH e NOLAN, 1995) e apresenta potencial terapêutico no tratamento da alodinia e hiperalgesia (PRICE *et al.*, 1994).

O uso da quetamina pela via subaracnóidea pode causar relaxamento cervical, por possuir um início de ação rápido, devido à sua elevada lipossolubilidade (REBOSO e

GONZALEZ, 1999). Ela se fixa às proteínas plasmáticas e penetra rapidamente nos tecidos bem irrigados, redistribuindo-se posteriormente nos músculos e tecidos magros e, finalmente, no tecido adiposo. Parte do fármaco difunde-se neste último, por ter característica especialmente lipofílica, sendo um dos motivos pelos quais promove relaxamento cervical (SPINOSA *et al.*, 2002).

Errando *et al.* (2004) demonstraram que a quetamina produz bloqueio sensitivo e motor quando administrada por via subaracnóidea. A associação anestésica e analgésica de quetamina se relaciona com o efeito antagonista sobre os receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) que têm implicações na percepção de dor e no desenvolvimento da dor crônica. A única ação sobre os receptores NMDA pode não ser suficiente para explicar a produção de anestesia ou analgesia deste fármaco. Como referem Church e Lodge (1990), a multiplicidade de sítios reguladores no complexo receptor NMDA, junto a sua ampla distribuição no SNC, sugere que os eventos mediados pelo receptor são muito importantes para a função normal do sistema nervoso central.

Além disso, tem-se descrito outros mecanismos de ação da quetamina como a interação de receptores opiáceos agindo como agonistas; interação com receptores colinérgicos centrais atuando como antagonista; interação com canais de cálcio e um efeito anestésico local (DEROSSI *et al.*, 2005).

A administração de quetamina por via subaracnóidea em cães produziu bloqueio motor e analgesia similar a lidocaína. O sinal clínico avaliado foi a incapacidade do animal de se manter em pé. Outro estudo, realizado em suínos, demonstrou que a administração de quetamina surtiu efeito anestésico 50 segundos após aplicação, tendo duração de 30 minutos e desaparecimento dos efeitos 45 minutos após esta aplicação (ERRANDO *et al.*, 1999).

2.3 Inseminação Artificial em Ovinos

2.3.1 Anatomia da cérvix da ovelha

A cérvix tem diversas funções no processo reprodutivo: facilita o transporte espermático através do muco cervical para o interior do útero; atua como reservatório de espermatozoides; e pode colaborar na seleção de células espermáticas viáveis, impedindo a passagem de

algumas inviáveis e defeituosas (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Anatomicamente, a cérvix ovina é um órgão fibroso que tem comprimento de 4 a 7 centímetros, conecta o útero com a vagina (EVANS e MAXWELL, 1990) e é composto predominantemente de tecido conjuntivo e muito pouco tecido muscular (EVANS e MAXWELL, 1990; HAFEZ e HAFEZ, 2004). Desde que as propriedades do tecido conjuntivo dependem do tipo, da concentração e das interações das moléculas que compõem a matriz extracelular, as características funcionais da cérvix são alteradas dramaticamente pelas modificações nestas variáveis (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

A cérvix caracteriza-se por uma espessa parede e uma luz constricta sendo que o canal cervical é formado por várias proeminências. Nos ruminantes estas têm a forma transversa ou espiralada, com saliências fixas, conhecidas por anéis cervicais. Na ovelha, adaptam-se um ao outro, ocluindo parcialmente a cérvix com segurança, protegendo o útero da entrada de microorganismos (EVANS e MAXWELL, 1990; HAFEZ e HAFEZ, 2004). Permanece firmemente fechada, exceto durante o estro, quando se relaxa levemente, permitindo a entrada dos espermatozoides no útero e durante o trabalho de parto (EVANS e MAXWELL, 1990; HAFEZ e HAFEZ, 2004). É importante lembrar que a vagina da ovelha contém pregas, as quais podem produzir espaços cegos ao redor do óstio cervical externo. O reconhecimento destas pregas é fundamental para que se possa introduzir com eficiência o aplicador de sêmen durante a IA ou outros instrumentos (HALBERT *et al.*, 1990).

Estudos sobre a anatomia da cérvix ovina reportam que o canal cervical apresenta-se com as seguintes características gerais: uma porção caudal de entrada pelo orifício externo, uma porção medial na qual as reentrâncias são maiores e mais profundas, e uma porção cranial, próxima ao corpo uterino, na qual estes obstáculos são menos evidentes (Figura 1). Esta distribuição irregular resulta numa luz cervical reduzida, dificultando a passagem de instrumentos transcervicalmente (HALBERT *et al.*, 1990).

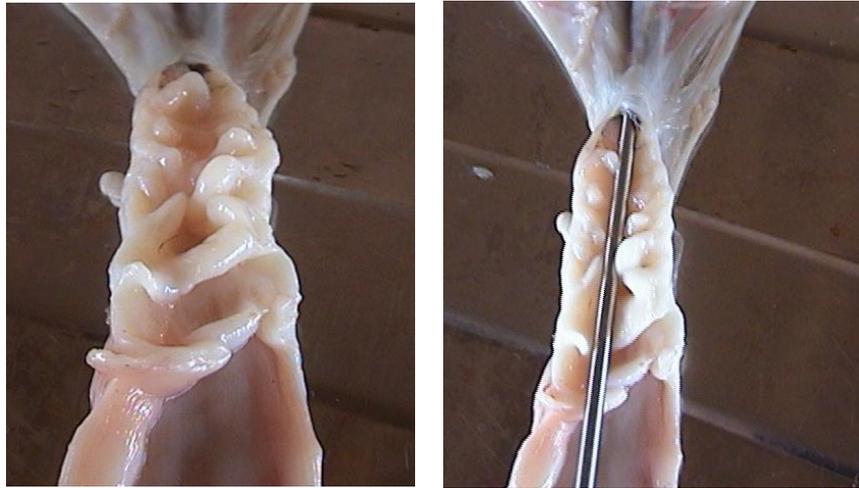


Fig. 1. Cérvix ovina aberta, demonstrando os anéis cervicais, suas reentrâncias e o aplicador transpondo-os (peça de abatedouro). Carneiro, 2010 (arquivo pessoal)

Segundo HALBERT *et al.* (1990), a classificação prévia do canal cervical poderia ser usada para prever o desempenho na transposição da cérvix durante a IA transcervical. Neste sentido, esses autores classificaram anatomicamente o orifício cervical externo das ovelhas em quatro tipos básicos: bico de pato, espiral, roseta e “flap”/aba (Figura 2). Foi verificado, de um modo geral, e para todas as raças estudadas (Suffolk, Cheviot, Dorset, entre outras), uma maior frequência dos tipos roseta (35%) e *flap* (35%). As classificações dos tipos bico de pato e espiral foram encontradas em 30% dos casos. Entretanto, estes resultados não indicaram uma clara relação entre os tipos e o comprimento, número de anéis presentes ou a largura do ponto mais estreito e do mais largo da cérvix. Sendo assim, um inseminador não poderia usar a classificação dos orifícios externos cervicais para prever diferenças do canal de ovelhas inseminadas.



Fonte: Kershaw et al. (2005)

Fig. 2. Classificação anatômica do orifício cervical externo segundo HALBERT *et al.* (1990). (a) Bico de pato, (b) espiral, (c) roseta, (d) (e) papila ou “flap”/aba

O grau de facilidade em transpor a cérvix pode variar de acordo com diferentes fatores: individual, estágio reprodutivo, intervalo pós-parto, ordem de parto, estação reprodutiva, experiência do técnico, entre outros (BUCKRELL *et al.*, 1994).

Windsor (1995) verificou que a taxa de penetração cervical aumentava quanto maior era a ordem de partos de uma ovelha (21,1; 41,2 e 43,4% para ovelhas com 1, 2 e 3 partos, respectivamente). Este fato é esperado em vista do extenso estiramento cervical que ocorre a cada parição. Segundo o autor uma estratégia inteligente seria excluir dos programas ovelhas nulíparas e primíparas.

Uma vez que as características anatômicas da cérvix ovina apresentam diferenças entre as raças, o conhecimento da estrutura cervical dos diversos genótipos poderá permitir maior ou menor facilidade de transposição da cérvix, com efeitos diretos na prenhez (HALBERT *et al.*, 1990; SOUZA *et al.*, 1994), o que pode contribuir para o desenvolvimento de programas comerciais de IA usando a técnica transcervical (HALBERT *et al.*, 1990).

2.3.2 Técnicas de inseminação artificial

As primeiras inseminações artificiais realizadas em ovelhas datam do ano de 1901 (MIES FILHO, 1987). O sêmen era depositado tanto no canal cervical com auxílio de um espéculo vaginal e da seringa de microdoses (inseminação cervical superficial), como na região mais cranial do canal, sem necessidade de vaginoscópio (inseminação intravaginal ou vaginal), (Figura 3). Estes métodos eram utilizados somente para sêmen fresco, pois naquela época ainda não havia sido desenvolvida a criopreservação. Ainda hoje se utiliza sêmen fresco para a prática da IA, porém este tem limitações quando comparado com o sêmen congelado, por exemplo, menor longevidade, o que é um fator impeditivo para a exportação e importação de material genético.

Existem ainda outros dois métodos de inseminação artificial para ovelhas: o transcervical e o laparoscópico, que permitem a utilização de sêmen congelado, (Figura 3). A via laparoscópica apresenta melhores resultados por permitir a deposição intrauterina do sêmen, no entanto, se trata de um procedimento cirúrgico e exige equipamentos caros, sendo economicamente inviável para a maioria dos rebanhos comerciais. Já a IA transcervical apresenta a desvantagem da anatomia, isto é, tamanho e forma do óstio externo e do canal cervical, que representam uma grande barreira para este método (KERSHAW *et al.*, 2005;

ANEL *et al.*, 2006), assim como para a transferência de embriões (TE) (BUNCH e ELLSWORTH, 1981). Uma das razões do uso limitado da IA pela via transcervical deve-se aos resultados inferiores obtidos quando comparados aos da laparoscopia (Tabela 1).

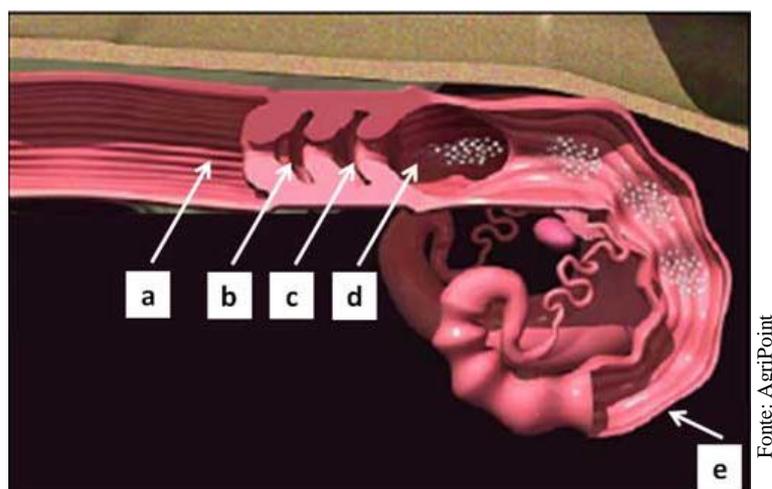


Fig. 3. Esquema representativo do local de deposição do sêmen e suas respectivas denominações das técnicas de inseminação artificial em ovinos: (a) Inseminação vaginal, (b) Inseminação cervical superficial, (c) Inseminação cervical profunda, (d) Inseminação intra-uterina pela via transcervical e, (e) Inseminação intra-uterina por laparoscopia

Tab. 1. Taxas de prenhez de ovelhas, de acordo com o método de inseminação artificial e o tipo de sêmen utilizado

AUTORES	ANO	MÉTODO IA	DIFERENCIAL	SÊMEN	n	TAXA PRENHEZ
McKusick <i>et al.</i>	1998	Laparoscopia Transcervical	Guelph System	congelado	121	43,9 ^a 20,7 ^b
Milczewski <i>et al.</i>	2000	Laparoscopia Cervical		resfriado	91	85,71 ^a 21,74 ^b
Barbas <i>et al.</i>	2003	Cervical	Cassou	fresco	430	43,94
Wulster-Radcliffe <i>et al.</i>	2004	Laparoscopia Transcervical	Vaginoscópio	fresco	420	41 ^a 4 ^b
Anel <i>et al.</i>	2005	Laparoscopia Cervical	Cateter IMV	congelado resfriado	44448 (8 anos)	44,89 ^a 31,25 ^b
Fair <i>et al.</i>	2005	Laparoscopia Transcervical	Misoprostol	congelado	59	54 ^a 28 ^b
Rabassa <i>et al.</i>	2007	Laparoscopia Transcervical		congelado	70	40
Hiwasa <i>et al.</i>	2009	Laparoscopia Cervical		congelado fresco congelado	80	72,2 ^a 5,5 ^b 0 ^b
Gündüz <i>et al.</i>	2010	Transcervical	Carazolol	congelado fresco	300	40 ^b 65 ^a

(Letras diferentes representam diferença significativa ($P < 0,05$) para taxa de prenhez, dentro de cada experimento)

2.3.2.1 Inseminação Artificial Transcervical

Na tentativa de diminuir os custos da IA com sêmen congelado e permitir que essa técnica seja mais difundida na espécie ovina, foi desenvolvida a técnica de IA transcervical, que teria maior aplicabilidade por ser um método não-cirúrgico. Para que a sua utilização fosse possível foram estudadas várias técnicas com o intuito de minimizar a barreira imposta pelas limitações anatômicas. Dentre elas, avaliou-se a utilização de substâncias como a ocitocina (SAYRE e LEWIS, 1996), a relaxina e a cocaína, as prostaglandinas e as interleucinas, e a utilização de catéter flexível, no entanto, todas apresentaram resultados variáveis quanto à taxa de concepção (NAQVI *et al.*, 2005). Ainda assim, com a mesma meta de reduzir os baixos resultados decorrentes da dificuldade anatômica da IA transcervical, foi desenvolvida a técnica de fixação da cérvix (FUKUI e ROBERTS, 1977) e tração (HALBERT *et al.*, 1990) até a abertura vulvar, diminuindo, com essa manobra, a sua sinuosidade.

Essa tração da cérvix é realizada com o auxílio de um espécuro, munido de fonte de luz. Para tanto expõe-se o canal vaginal, facilitando a visualização do óstio cervical externo; em seguida fixa-se a cérvix com o auxílio de uma pinça *Allis* e, posteriormente, ela é tracionada com a ajuda de duas pinças *Pozzi*; logo inicia-se a tentativa de passagem do aplicador (Figura 4), técnica semelhante à usada por Andersen *et al.* (1973) e Halbert *et al.* (1990); após alcançar a luz uterina, procede-se então a aplicação do sêmen, previamente descongelado.



Fig. 4. Passagem do aplicador pela cérvix da ovelha, utilizando duas pinças *Pozzi* e o aplicador expansor transcervical. Carneiro, 2010 (arquivo pessoal)

Souza *et al.* (1994) testaram dois métodos de inseminação transcervical, utilizando sêmen congelado, ovelhas sob estro natural e aplicador do tipo *Cassou*, realizando um método

de tração em um dos grupos. Para o grupo inseminado sem tração foi obtido menor grau de profundidade, já para o grupo com tração alcançou-se maior profundidade cervical em decorrência da distensão do canal e suas dobras. Os percentuais de prenhez alcançados (45% e 28,95%, com tração e sem tração, respectivamente) não foram influenciados pelo grau de penetração cervical superficial ou profundo. O grupo controle inseminado por laparoscopia alcançou taxa de prenhez de 57,14%, superior apenas ao alcançado pela IA sem tração, e semelhante a IA com tração. Sendo assim, os autores recomendam a IA transcervical com tração como alternativa à laparoscopia, ressaltando os cuidados necessários que se deve ter com este procedimento.

Para otimizar o procedimento de transposição cervical com tração em ovelhas, DeRossi *et al.* (2009) utilizaram anestesia subaracnóidea com quetamina, na dose de 1,5 mg/kg, visando um melhor relaxamento da cérvix para facilitar a passagem da pipeta de IA. Estes autores não avaliaram a fertilidade pós-IA e nem a condição de bem-estar dos animais durante o procedimento, no entanto o objetivo proposto no estudo foi alcançado. Entretanto, a duração da anestesia foi muito prolongada, visto que, para realizar o procedimento de IA o tempo necessário é de cerca de 15 minutos, enquanto a anestesia durou 30 minutos.

A vantagem do tratamento seria produzir analgesia, relaxamento de vulva, vagina e do canal cervical, suficientes para realização dos procedimentos biotecnológicos em ovinocultura. E, também, evitar a contração uterina que é observada quando o tratamento é feito a base de outras drogas, como ocitocina e misoprostol (BARBAS *et al.*, 2001). Esta contração diminui a fertilidade (SAYRE e LEWIS, 1996), sendo, portanto um fator negativo a ser considerado na adoção de alternativas que facilitem a passagem de aplicadores na IA.

O uso de acepromazina e lidocaína foi recentemente indicado por Fonseca *et al.* (2011) para realizar TE em pequenos ruminantes, com o intuito de fornecer tranquilização e anestesia local durante procedimentos não cirúrgicos, ou seja, transcervical. O anestésico local (lidocaína) é colocado, com auxílio de gaze, diretamente no óstio cervical externo, provavelmente reduzindo ou até eliminando a dor causada pelas pinças de tração. No entanto, esse fármaco não realiza relaxamento cervical, visto que os autores necessitaram utilizar dilatares uterinos tipo Hegar, para posteriormente transpor a cérvix.

O sucesso da IA, em ovinos, ou de programa de transferência de embriões depende do desenvolvimento de métodos menos invasivos do que a laparoscopia ou procedimentos dolorosos. O uso de quetamina subaracnóidea pode ser uma alternativa tecnicamente viável e

menos dispendiosa, permitindo a utilização destas técnicas sem causar nenhuma dor, desconforto ou estresse para as ovelhas.

3 REFERÊNCIAS

- AMERICAN COLLEGE OF VETERINARY ANESTHESIOLOGISTS. Position paper on treatment of pain in animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, p.628-630, 1998.
- ANDRADE, S.F. Analgésicos. In:_____. **Manual de terapêutica veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2002. p.77-86.
- ANDERSEN, V.K.; AAMDAL, J.; FOUGNER, J.A. Intrauterine and deep cervical insemination with frozen sêmen in sheep. **Zuchthygiene**, v.8, n.3, p.113-118, 1973.
- ANEL, L.; KAABI, M.; ABROUG, B. *et al.* Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. **Theriogenology**, v.63, p.1235–1247, 2005.
- ANEL, L.; ALAVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F. *et al.* Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, n.2, p.30-42, 2006.
- BARBAS, J.P.; GONÇALVES, S.C.; MARQUES, C.C. *et al.* Efeito da aplicação vaginal de agentes dilatadores do cérvix durante a fase folicular do ciclo em ovelhas. IN: CONGRESSO IBÉRICO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 3, 2001, Porto. **Anais**. Vale de Santarém: Estação Zootécnica Nacional. 2001, p.299-307.
- BARBAS, J.P.; GONÇALVES, S.C.; BAPTISTA, M.C. *et al.* Effect of vaginal application of cervix dilating agents (misoprostol and terbutalin) on AI results in ovine Portuguese local breeds. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.98, p.185–188, 2003.
- BORJA, M.C. **Avaliação da dor no pós-operatório de artroscopia em equinos**. 2008. p.72. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BREEN, K.M.; BILLINGS, H.J.; WAGENMAKER, E.R. *et al.* Endocrine basis for disruptive effect of cortisol on preovulatory events. **Endocrinology**, v.146, n.4, p.2107-2115, 2005.
- BRISTOW, D.J.; HOLMES, D.S. Cortisol levels and anxiety-related behaviors in cattle **Physiology & Behavior**, v.90, p.626–628, 2007.

- BROOM, D.M. Indicators of poor welfare. **British Veterinary Journal**, v.142, p.524-526, 1986.
- BROOM, D. Animal welfare: Concepts and measurements. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4167-4175, 1991.
- BROOM, D.M.; JOHNSON, K.G. **Stress and animal welfare**. London: Chapman e Hall, 1993. 211p.
- BROOM, D.M.; MOLENTO, C.F.M. Bem-Estar Animal: conceito e questões relacionadas – revisão. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.2, p.1-11, 2004.
- BUCKRELL, B.C.; BUSCHBECK, C.; GARTLEY, C.J. *et al.* Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen sêmen. **Theriogenology**, v.42, p.601–611, 1994.
- BUNCH, T.D., ELLSWORTH, H.S. Gross anatomy of the ovine cervix. **International Goat & Sheep Research**, v.1, p.282–285, 1981.
- CARLSON, N.R. Os Transtornos de Ansiedade, o Autismo e o Estresse. In:_____. **Fisiologia do Comportamento**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2002. cap.18, p.557-581.
- CARROL, G. Tratamento da dor perioperatória. In: FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, 2002. p.94–99.
- CFMV – CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Resolução nº 877, de 15 de fevereiro de 2008**. Dispõe sobre os procedimentos cirúrgicos em animais de produção e em animais silvestres; e cirurgias mutilantes em pequenos animais e dá outras providências. Disponível em: <http://www.cfmv.org.br/portal/legislacao/resolucoes/resolucao_877.pdf>. Acesso em: 04 set 2011.
- CHAVES L.D.; PIMENTA C.A.M. Controle da dor pós-operatória: comparação entre métodos analgésicos. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.11, n.2, p.215-219, 2003.
- CHATTERTON, R.T. The role of stress in female reproduction: animal and human considerations. **International Journal of Fertility**, v.35, p.8-13, 1990.
- CHURCH, J.; LODGE, D. N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) antagonism is central to the actions of ketamine and other phencyclidine receptor ligands. In: Domino, E.F. **Status of ketamine in anaesthesiology**. Ann Arbor: NNP Books, 1990. p.501-19.
- CODA, B.A. Opioids. In: BARASH, P.G.; CULLEN, B.F.; STOELTING, R.K. **Clinical Anaesthesia**. 6.ed. Lippincott: Williams & Wilkins, cap.19, p.465-497, 2009.

- DEROSSO, R., JUNQUEIRA, A.L., LOPES, R.A. *et al.* Use of ketamine or lidocaine or in combination for subarachnoid analgesia in goats. **Small Ruminant Research**, v.59, p.95-101, 2005
- DEROSSO, R.; CARNEIRO, R.P.B.; OSSUNA, M.R. *et al.* Sub-arachnoid ketamine administration combined with or without misoprostol/oxytocin to facilitate cervical dilation in ewes: A case study. **Small Ruminant Research**, v.83, p.74-78, 2009.
- DUNCAN, I.J.H. Welfare is to do with what animals feel. **Journal of Agricultural e Environmental Ethics**, v.6, p.8-14, 1993.
- ERRANDO, C.L.; SIFRE, C.; MOLINER, S. *et al.* Subarachnoid ketamine in swine - Pathological findings after repeated doses: acute toxicity study. **Regional Anesthesia and Pain Medicine**, v.24, p.146-152, 1999.
- ERRANDO, C.L.; SIFRE, C.; MOLINER, S. *et al.* Utilización de ketamina para anestesia subaracnoidea durante hipovolemia. Estudio experimental preliminar en cerdos. **Revista Española de Anestesiología y Reanimación**, v.51, p.3-11, 2004.
- EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. España: Zaragoza, 1990. 192p.
- FAIR, S.; HANRAHAN, J.P.; O'MEARA, C.M. *et al.* Differences between Belclare and Suffolk ewes in fertilization rate, embryo quality and accessory sperm number after cervical or laparoscopic artificial insemination. **Theriogenology**, v.63, p.1995–2005, 2005.
- FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação**. Estatísticas FAO. 2007. Disponível em: <www.fao.org>. Acesso em: 06 mai 2011.
- FISHER, A.D.; CROWE, M.A.; DE LA VAGRA, M.E.A. *et al.* Effect of castration method and the provision of local anaesthesia on plasma cortisol, scrotal circumference, growth and feed intake of bull calves. **Journal of Animal Science**, v.74, p.2336–2343, 1996.
- FONSECA, J.F.; OLIVEIRA, M.E.F.; VIANA, J.H.M. Uso de procedimentos não cirúrgicos para a produção, recuperação e inovulação de embriões em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.113-117, 2011.
- FUKUI, Y. ROBERTS, E. M. Repeatability of non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. **Theriogenology**, v.8, p.77-81, 1977.
- GEBHARDT, B. Epidural and intrathecal administration of ketamine – pharmacology and clinical results. **Anaesthetist**, v.43, n.2, p.34-40, 1994.
- GRANT, C. Behavioural responses of lambs to common painful husbandry procedures. **Applied Animal Behaviour Science**, v.87, p.255–273, 2004.
- GREENE, S.A. (Ed.) **Veterinary Anesthesia and Pain Management Secrets**. Philadelphia: Hanley and Belfus Inc., 2004. 369p.

- GRIESEN, J.; HOKLAND, M.; GROFTE, T. *et al.* Acute pain induces an instant increase in natural killer cell cytotoxicity in humans and this response is abolished by local anaesthesia. **British Journal of Anaesthesia**, v.83, p.235–240, 1999.
- GÜNDÜZ, M.C.; TURNA, O.; CIRIT, U. *et al.* Lambing rates and litter size following carazolol administration prior to insemination in Kivircik ewes. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.32–36, 2010.
- HAFEZ, B., HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7^a ed. Barueri: Manole, 2004, 513p.
- HALBERT, G.W.; DOBSON, H.; WALTON, J.S. *et al.* The structure of the cervical canal of the ewe. **Theriogenology**, v.33, p.977–992, 1990.
- HELLEBREKERS, L. J. **Dor em Animais**. São Paulo: Manole, 2002, 166p.
- HIWASA, M.; KOHNO, H.; TOGARA, T. *et al.* Fertility after different artificial insemination methods using a synthetic sêmen extender in sheep. **Journal of Reproduction and Development**, v.55, n.1, p.50-54, 2009.
- HÖTZEL, M.J.; MACHADO FILHO, L.C.P. Bem-estar Animal na Agricultura do Século XXI. **Revista de Etologia**, v.6, n.1, p.03-15, 2004.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Pesquisa Pecuária Municipal, 2010. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=4&uf=00>>. Acesso em: 06 mai 2011.
- INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. **Pain** 1986, n.3, 225p.
- ISLAS, J.A.; ASTORGA J.; LAREDO, M. Epidural ketamine for control of postoperative pain. **Anesthesia & Analgesia**, v.64, p.1161-1162, 1985.
- KAMERLING, S.G. O sistema sensorial somático. In: REECE, W.O. (ed). **Fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., cap. 45, p.763-784, 2006.
- KERSHAW, C.M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M.R. *et al.* The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v.64, p.1225–1235, 2005.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>>. Acesso em: 06 mai 2011.
- MCKUSICK, B.C.; THOMAS, D.L.; GOTTFREDSON, R.G., *et al.* **A comparison of transcervical and laparoscopic intrauterine artificial insemination techniques on reproductive performance of ewes**. Department of Animal Sciences, Arlington Agricultural Research Station, and Spooner Agricultural Research Station. University of Wisconsin-Madison. Disponível em: <http://www.ansci.wisc.edu/extension-new%20copy/sheep/Publications_and_Proceedings/Pdf/Reproduction/Transcervical%20and

- %20laparoscopic%20artificial%20insemination%20techniques.pdf>. Acessado em: 14 mar 2011.
- MELLOR, D.J.; MOLONY, V.; ROBERTSON, I.S. Effects of castration on behaviour and plasma cortisol concentrations in young lambs, kids and calves. **Research in Veterinary Science**, v.51, p.149–154, 1991.
- MENDL, M. Assessing the welfare state. **Nature**, v.410, p.31-32, 2001.
- MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6ª ed., v. 2. Porto Alegre: Sulina. 1987. 750p.
- MILCZEWSKI, V.; KOZICKI, L.E.; LUZ, S.L.N. *et al.* Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.35-39, 2000.
- NAQVI, S.M.K.; PANDEY, G.K.; GAUTAM, K.K. *et al.* Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p.337–344, 2005.
- PRICE, D.D.; MAO, J.; FRENK, H. *et al.* The N-metyl-D-aspartate receptor antagonist dextromethorphan selectively reduces temporal summation of second pain in man. **Pain**, v.59, p.165-74, 1994.
- PRITCHETT, L.C.; ULIBARRI, C.; ROBERTS, M.C. *et al.* Identification of potential physiological and behavioral indicators of postoperative pain in horses after exploratory celiotomy for colic. **Applied Animal Behaviour Science**, v.80, p.31–43, 2003.
- QUANDT, J.E.; LEE, J.A.; POWELL, L.L. Analgesia in critically ill patients. **The Compendium on Continuing Education Practice Veterinary-Small Animal**, v.27 n.6, p.433–445, 2005.
- RABASSA, V.S., TABELEÃO, V.C., PFEIFER, L.F.M. *et al.* Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo-fixo. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.1, p.127-133, 2007.
- RAUSER, P.; DVORÁK, M.; NECAS, A. *et al.* Effect of intraarticular bupivacaine administration on postoperative pain relief after arthroscopic or arthroscopic management of cranial cruciate ligament rupture in dogs. **Acta Veterinaria Brunensis**, v.74. p.613–619, 2005.
- REBOSO, J.A., GONZALEZ, F. Ketamina. **Revista Española de Anestesiología y Reanimación**, v. 46, p.111-122, 1999.
- RUSHEN, J. Aversion of sheep to electro-immobilization and physical restraint. **Applied Animal Behaviour Science**, v.15, p.315 – 324, 1986.
- SAYRE, B. L.; LEWIS, G. S. Cervical dilatation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewe. **Theriogenology**, v.45, p.1523- 1533, 1996.

- SHUTT, D.; FELL, L.; CONNELL, R. *et al.* Stress responses in lambs docked and castrated surgically or by the application of rubber rings. **Australian Veterinary Journal**, v.65, p.5–7, 1988.
- SKARDA R.T. Local and regional anesthetic and analgesic techniques in dogs. In: Lumb & Jones. **Veterinary Anesthesia**. 3 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p.426- 447. 1996.
- SMITH, R.F.; DOBSON, H. Hormonal interactions within the hypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.75-85, 2002.
- SÓRIO, A. **Sistema agroindustrial da carne ovina: o exemplo de Mato Grosso do Sul**. Passo Fundo: Méritos. 2009. 112p.
- SOUZA, M.I.L.; LUZ, S.L.N.; GONÇALVES, P.B.D. *et al.* Inseminação transcervical com sêmen congelado em ovinos. **Ciência Rural**, v.24, n.3, p.597-602, 1994.
- SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. 3º ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002, p.129-138 e p.354-361.
- VARLEY, M.; STEDMAN, R. Stress and reproduction. In: COLE, D.J.A.; WEISSMAN, J; VARLEY, M.A. (ed). **Principles of pig science**. Nottingham: Nottingham University Press, cap.15, p.227-297, 1994.
- VIANA J.G.A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, Porto Alegre, n.12, Março de 2008.
- WATERMAN-PEARSON, A.E. Peri-operative analgesia. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF VETERINARY ANAESTHESIOLOGY, 6^o 1997, Greece. **Proceeding**. 1997, p.13-20,
- WEARY, D.M.; NIEL, L.; FLOWER, F.C. *et al.* Identifying and preventing pain in animals. **Applied Animal Behaviour Science**, v.100, p.64–76, 2006.
- WELSH, E.M.; NOLAN, A.M. The effect of abdominal surgery and thresholds to thermal and mechanical stimulation in sheep. **Pain**, v.60, p.159-66, 1995.
- WINDSOR, D.P. Factors influencing the success of transcervical insemination in Merino ewes. **Theriogenology**, v.43, p.1009-1018, 1995.
- WULSTER-RADCLIFFE M.C.; WANG, S.; LEWIS, G.S. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. **Theriogenology**, v.62, p.990–1002, 2004.

BEM-ESTAR E TAXA DE PREENHIZ DE OVELHAS SUBMETIDAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL SOB ANESTESIA SUBARACNÓIDEA

Resumo

Este trabalho teve como objetivo verificar o uso de anestesia subaracnóidea, em duas doses diferentes, durante os procedimentos de inseminação artificial (IA) transcervical ovina, sobre o bem-estar animal e a eficiência reprodutiva. Cento e vinte ovelhas adultas pluríparas, da raça Suffolk, foram submetidas à sincronização de estro e foram selecionadas 90 ovelhas pela expressão de cio para compor o experimento. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três tratamentos diferentes: Controle, anestesia subaracnóidea utilizando quetamina na dose de 1,5 mg/kg (AN-1,5) e 0,75 mg (AN-0,75), cinco minutos antes do procedimento de tração cervical. Utilizou-se sêmen congelado ($n = 2$), previamente analisado para fertilidade. Os procedimentos de anestesia foram realizados pelo mesmo técnico, assim como a tração cervical e a IA. Durante os procedimentos de IA, foram registradas reações comportamentais. O diagnóstico de gestação foi feito 35 dias após a IA por ultrassonografia. O uso da anestesia diminuiu as vocalizações ($P < 0,05$) e a contração abdominal ($P < 0,05$) durante os procedimentos de manipulação genital. No momento de pinçamento da cérvix e passagem do aplicador, foi observado maior frequência de gemidos e vocalizações para o grupo controle ($P < 0,05$). A tração de cérvix foi facilitada pela anestesia, uma vez que no grupo controle houve uma frequência maior de tração apenas até a metade da vagina ($P < 0,05$). Como resultado houve um aumento na taxa de prenhez ($P < 0,05$) de 40,0%, 56,7% e 66,7% para Controle, AN-1,5 e AN-0,75, respectivamente. A taxa de prenhez variou significativamente ($P < 0,05$) em função da contração abdominal e do sucesso na tração cervical. Não foi observado efeito do tratamento na facilidade de passagem da cérvix e local de deposição do sêmen, nem diferença entre os machos utilizados ($P > 0,05$). Os animais do grupo controle apresentaram comportamentos associados à imobilidade absoluta, sugestiva de distresse. Em suma, o uso da anestesia subaracnóidea com quetamina, em procedimentos de inseminação artificial ovina, facilitou a tração cervical, beneficiou o bem-estar e aumentou a taxa de prenhez.

PALAVRAS CHAVE: biotecnologia da reprodução, dor, estresse, fertilidade

**WELFARE AND PREGNANCY RATE OF EWES TRANSCERVICALLY INSEMINATED UNDER
SUBARACHNOID ANESTESIA**

Abstract

This work aimed to verify the use of 2 different doses of subarachnoid anesthesia during the procedures of artificial insemination (AI) transcervical, over the welfare and reproductive performance of ewes. One hundred and twenty Suffolk adult ewes were submitted to estrus synchronization and 90 were selected after estrus detection (twice daily). The animals were randomized in three different treatments being control, subarachnoid anesthesia with ketamin dose of 1.5 mg/Kg (AN-1,5) or 0.75 mg/Kg (AN-0,75) five minutes before cervical traction procedure. The intrauterine insemination was performed using frozen semen previously analyzed for fertility (n = 2). The anesthesia procedures were performed by the same technician. A blind technician proceeded the cervical traction and insemination. During AI procedures, behavioral reactions were registered. Pregnancy diagnosis was done 35 days after AI by ultrasonography. The use of anesthesia decreased ewes vocalizations (P<0.05) and abdominal contraction (P<0.05) during the procedures of genital manipulation. At the moment of cervix clamping and the applicator passage through the cervix, were observed more groan and vocalizations for control group (P<0.05). The cervix traction was facilitated by anesthesia, once for the control group most part of the cervix traction was done just up to the half of the vagina (P<0.05). As a result there was an increasing on pregnancy rate (P<0.05) of 40.0%, 56.7% and 66.7% for Control, AN-1.5 and AN-0.75, respectively. The pregnancy rate was significantly different in function of abdominal contraction and the success of cervical traction. In this scenario was not observed any effect of treatment on the facility to overpass the cervix, the local of the semen deposition and no difference between males used. The control group showed behaviors associated to absolute immobility what is suggestive of distress. In brief, the use of ketamin of subarachnoid anesthesia for artificial insemination in ewes facilitated the cervical traction, increased pregnancy rate and improved the welfare.

KEYWORDS: fertility, pain, reproduction technologies, stress, welfare

1. Introdução

O procedimento de Inseminação artificial (IA) em ovelhas com sêmen congelado pode ser realizado por dois métodos: o transcervical ou laparoscópico, por permitirem a deposição intrauterina do sêmen. A via laparoscópica apresenta melhores resultados, entre 44,9% [1] e até 85,7% de taxa de prenhez [2], no entanto, se trata de um procedimento cirúrgico e exige equipamentos caros, sendo economicamente inviável para a maioria dos rebanhos comerciais. Já a IA transcervical apresenta a desvantagem do tamanho e forma do óstio externo e do canal cervical, que representam uma grande barreira para este método [3, 4], que alcança taxas em torno de 40% de prenhez [1, 5 e 6], sendo portanto uma das razões do uso limitado desta técnica quando comparados aos conseguidos por laparoscopia.

A manipulação de vagina e cérvix, em ovelhas, pode promover estresse agudo, manifestado na forma de dor, podendo causar trauma significativo para genitália interna e, interferir na fertilidade [7]. Quando um animal sente dor ocorre liberação de opióides endógenos que inibem a secreção de GnRH, logo, ocorre bloqueio na secreção de LH, conseqüentemente atrasando ou bloqueando a ovulação [8], diminuindo a fertilidade, sendo prejudicial para o desempenho das biotécnicas reprodutivas.

Numa época em que a responsabilidade do ser humano no uso dos animais tem sido cobrada mundialmente, a adoção de técnicas de manejo que melhorem o bem-estar animal é um procedimento ético no trato com os animais, valorizado no mercado. Além disso, a diminuição do estresse durante um processo de IA pode trazer benefícios fisiológicos que venham resultar em maior fertilidade.

Com o intuito de otimizar a transposição cervical em ovelhas, DeRossi *et al.* [7] utilizaram anestesia subaracnóidea com quetamina na dose de 1,5 mg/kg, visando um melhor

relaxamento da cérvix, o que facilitou a passagem da pipeta de IA. Entretanto, a duração da anestesia foi muito prolongada, visto que, para realizar o procedimento de IA o tempo necessário é de cerca de 15 minutos, enquanto os efeitos anestésicos duraram 30 minutos. Estes autores não avaliaram a fertilidade pós-IA e nem a condição de bem-estar dos animais durante os procedimentos. Segundo eles, a anestesia subaracnóidea, pode diminuir ou eliminar a dor e induzir o relaxamento do canal cervical, facilitando a passagem do catéter transcervical, pipetas ou aplicador de sêmen, alcançando o útero da ovelha.

Neste trabalho pretendeu-se verificar se o uso de anestesia subaracnóidea, durante os procedimentos de inseminação artificial transcervical com tração em ovinos, melhora o bem-estar animal e a eficiência reprodutiva.

2. Material e Métodos

O experimento realizou-se em uma propriedade rural (latitude 20°38'S, longitude 54°28'W) do município de Campo Grande, Estado de Mato Grosso do Sul - Brasil, durante dois meses de verão de 2010.

Cento e vinte ovelhas em estação reprodutiva, distribuídas em lotes de 20 animais cada, adultas e pluríparas da raça Suffolk, com cerca de quatro anos de idade e peso médio de 54,1 ± 5,9 kg, foram submetidas à sincronização do estro com duas aplicações de prostaglandina F₂α (Sincrocio[®] Lab. OuroFino- cloprostenol sódico), na dose de 0,125 mg/animal, com intervalo de 7 dias [9], e inseminadas após observação do estro, a qual fez-se com o auxílio de rufião, duas vezes ao dia. O horário das inseminações definiu-se de acordo com o método de Trimberger (TRIMBERGER, 1948 citado por MIES FILHO, 1987 [10]). O experimento foi

realizado em 90 ovelhas selecionadas pela expressão de estro, a partir da população sincronizada, distribuídas aleatoriamente em três tratamentos com 30 animais cada:

CONTROLE - inseminação transcervical convencional preconizada pelo idealizador do aplicador *expansor* transcervical de sêmen ovino [11];

AN-1,5 - inseminação transcervical com anestesia subaracnóidea utilizando quetamina na dose de 1,5 mg/kg, conforme proposto por DeRossi *et al.* [7];

AN-0,75 - inseminação transcervical com anestesia subaracnóidea utilizando quetamina na dose de 0.75 mg/kg.

Utilizou-se sêmen previamente congelado, em palhetas de 0,25 ml, analisado para o experimento [12], distribuindo-se os reprodutores da raça Suffolk (n=2) equitativamente nos grupos, mantendo-se o mínimo de dez fêmeas por macho. O sêmen, proveniente de três partidas, apresentou motilidade pós-descongelação média de 50%, percentual de patologia espermática de 10% e concentração média de 40 milhões de espermatozóides viáveis/dose.

A anestesia subaracnóidea foi aplicada na área lombo-sacral, previamente preparada com tricotomia e antissepsia com álcool iodado. A infiltração prévia com lidocaína se deu no espaço subcutâneo (botão anestésico). Identificando-se o espaço lombo-sacral pela depressão existente entre a última vértebra lombar e a primeira vértebra sacral, direcionou-se uma agulha calibre 30x8 mm no espaço subaracnóideo, num ângulo de 45° do plano mediano posterior. O correto posicionamento da agulha foi confirmado pela saída do líquido céfalo raquidiano através da mesma e a droga aplicada sem resistência.

Todo o procedimento de anestesia foi realizado pelo mesmo técnico, bem como o procedimento de IA.

Registraram-se frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR) e a temperatura de pele (Tpele) utilizando termômetro infravermelho digital (Raytek - MT) realizados em quatro momentos (MOM): basal (BASAL), após contenção (apCONT), após procedimento de tração cervical (apTRAÇÃO) e após IA (apIA), com a ovelha ainda contida na maca.

Antes da contenção para realizar o procedimento de IA (PRÉ-IA) e 8 minutos após o pinçamento da cérvix (PÓS-IA) coletou-se sangue por punção da veia jugular para dosagem de cortisol. As amostras foram resfriadas e posteriormente separou-se o soro para congelamento. A dosagem do cortisol (expressa em nmol/L) foi feita através de radioimunoensaio no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / UNESP, Campus de Botucatu – SP, Brasil, utilizando *kits* comerciais (Coat-A-Count[®] Cortisol – SIEMENS). Calculou-se diferença de cortisol (Δ Cort) entre a dosagem PÓS-IA e PRÉ-IA.

O procedimento de IA dividiu-se em subprocessos para as avaliações de comportamento:

- Contenção: momento da contenção da ovelha numa maca especialmente adaptada para procedimentos de IA;
- Anestesia: momento da aplicação da anestesia subaracnóidea;
- Espera: 5 minutos da aplicação do fármaco;
- Limpeza do reto: retirada das fezes retidas no reto para facilitar a introdução do dedo indicador no ânus do animal, auxiliando na manipulação da cérvix e acompanhamento da passagem do aplicador;
- Espéculo: exposição do canal vaginal por meio de um espéculo, munido de fonte de luz, facilitando a visualização da cérvix;

- Pinçamento da cérvix: identificado o óstio cervical externo este foi fixado com o auxílio de pinça *Allis* e, posteriormente, a cérvix, tracionada com a ajuda de duas pinças *Pozzi*;
- Passagem do aplicador: com o óstio cervical externo próximo à abertura da vulva, iniciou-se a passagem do aplicador de sêmen e após alcançar-se a luz uterina, fez-se a aplicação do sêmen, previamente descongelado à 37°C por 20 segundos.

Todos os procedimentos de IA foram filmados como método de registro direto do comportamento, para posterior avaliação das vocalizações, das tentativas de fuga, posicionamento da orelha [13] e as alterações de postura associadas à dor [14] como olhar, movimento de cabeça, ranger de dente, lambrer de lábios e o ato de cheirar tudo ao seu alcance.

Após o procedimento da IA alocou-se as ovelhas numa área cercada e o observador registrou comportamentos indicadores de dor ativa num protocolo de registro adaptado para animais adultos [14]. Neste caso, fez-se observação do tipo *scan*, em intervalos de dez minutos por um período de noventa minutos após o procedimento de IA. Observou-se: posição da ovelha (isolada ou em grupo); postura (em pé, deitada ou ajoelhada); movimento (parada, caminhando, cambaleando, pinçando ou arrastando os membros posteriores); vocalização (sem ocorrência, gemido ou berro); movimentos na boca (sem ocorrência, ruminação, movimentação, ranger de dentes ou lambrer de lábios) e posição das orelhas (para frente, para trás ou para baixo).

A avaliação da eficiência da IA realizou-se registrando as frequências das seguintes variáveis: turno da realização da IA; macho utilizado em cada ovelha; contração abdominal [sem contração (-), contrai pouco (+), contrai (++) e contrai com tenesmo (+++)]; facilidade da tração cervical [traciona-se até metade da vagina (+) ou até a vulva (++)]; tempo de pinçamento da cérvix (duração de tempo em que a cérvix da ovelha fica pinçada, contando do momento que fixa-se com a pinça *Allis* até o momento que soltam-se as pinças *Pozzi*);

presença de sangue durante o procedimento de IA [sem sangue (-), gotas de sangue (+) ou muito sangue dificultando a visualização do óstio cervical (++)]; grau de dificuldade em passar a cérvix [fácil e passa todos os anéis (+), média dificuldade, mas passa todos os anéis (++-), média dificuldade e não passa todos os anéis (+--), difícil e não passa todos os anéis (-)]; local de deposição do sêmen [uterina, intracervical profunda e primeiros anéis cervicais]; refluxo de sêmen e o tempo total do procedimento (duração de tempo que a ovelha fica na maca de contenção para realização dos procedimentos de IA).

O diagnóstico de gestação realizou-se por ultrassonografia transretal (Chison D600 Vet[®] com probe linear adaptada), após 35 dias da IA.

2.1 Análise estatística

A frequência das respostas comportamentais, das variáveis fisiológicas e da taxa de prenhez (TP) foram comparadas entre tratamentos.

Submeteram-se as variáveis fisiológicas à análise de variância de duas vias para medidas repetidas, tendo tratamento e momento como variáveis independentes. Para comparação de médias utilizou-se teste de Dunnet.

A variável dependente cortisol foi submetida à análise de variância utilizando o procedimento GLM do Programa Estatístico SAS [15], considerando os efeitos fixos de tratamento (TMT), momento (MOM), taxa de prenhez (TP) e suas interações. A Δ Cort foi submetida a análise de variância considerando os efeitos fixos: TMT, TP e sua interação. As comparações das médias foram realizadas pelo método de quadrados mínimos, utilizando o teste de Dunnet.

As variáveis comportamentais foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, própria para variáveis não paramétricas e, em caso de significância, realizou-se Teste de Mann-Whitney para comparação dos tratamentos par-a-par [16].

A TP foi submetida ao teste de Qui-quadrado para amostras independentes [16, 17]. Considerou-se o nível de significância de 5%.

3. Resultados e Discussão

Os valores médios normais para FC, FR e Tpele, em ovinos adultos são de 105 a 115 batimentos cardíacos/minuto, 45 a 96 movimentos respiratórios/minuto e 31 a 33,5°C, respectivamente [18, 19, 20, 21 e 22].

Entre momentos observou-se uma queda significativa da FC ($P < 0,05$) e um aumento significativo da FR em relação aos valores basais nas ovelhas CONTROLE; queda significativa da FC ($P < 0,05$) sem alteração da FR nas ovelhas do grupo AN-1,5; e nenhuma alteração das variáveis fisiológicas nas ovelhas do grupo AN-0,75 (Tabela 1). DeRossi *et al.* [7] utilizando o mesmo procedimento de anestesia não observaram variação significativa a partir da medida basal, tanto para FC como Tpele, no entanto, estes autores não avaliaram a FR.

Entre tratamentos houve alteração significativa ($P < 0,05$) somente para FR no momento apTRAÇÃO, sendo menor nos animais CONTROLE, (Tabela 1), o que pode ser considerado um sinal de dor aguda. O aumento acentuado da FR após a IA reforçam essa hipótese. Esse fato pode ser assemelhado ao *Freezing*, relatado por Broom e Johnson [23], que é um comportamento onde o animal (ruminante) paralisa de medo, sob condições de dor aguda,

apresentando respostas de pânico. Frente a agentes estressores os animais utilizam uma das quatro estratégias defensivas comportamentais básicas: fuga, imobilidade, ataque defensivo e submissão [24]. O que leva o animal a tomada de decisão são vários fatores como: características do ambiente (possível rota de fuga), distância do estímulo, experiência prévia com o estímulo, entre outras. Respostas de *freezing* já foram observadas em vacas doadoras de embriões [25] e vacas submetidas a IATF, com efeito sobre a eficiência reprodutiva [26].

A variável fisiológica Tpele não alterou significativamente ($P>0,05$) entre momentos e nem entre tratamentos (Tabela 1).

Tab. 1. Valores médios para FC, FR e Tpele, obtidos em diferentes momentos (basal, após contenção, após tração cervical e pós IA) do processo de IA transcervical, de ovelhas Sulffolk adultas, de acordo com o tratamento: inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE); inseminação artificial transcervical sob anestesia subaracnóidea com quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75) (Letras maiúsculas indicam diferença estatística entre tratamentos, e letras minúsculas indicam diferença entre momentos, dentro de tratamentos)

	CONTROLE				AN-1,5				AN-0,75			
	Basal	apCONT	apTRAÇÃO	apIA	Basal	apCONT	apTRAÇÃO	apIA	Basal	apCONT	apTRAÇÃO	apIA
FC	115,4 ^a	93,4 ^b	90,1 ^b	96,2 ^b	114,3 ^a	100,6 ^b	97,6 ^b	96,5 ^b	109,9	113,4	92,6	93,4
FR	56,9 ^b	58,1 ^b	49,9 ^b	72,2 ^a	63,8 ^A	57,8 ^A	64,5 ^B	63,1 ^A	57,2 ^A	55,7 ^A	64,4 ^B	65,5 ^A
Tpele	33,2	33,0	32,1	33,1	32,3	32,1	32,0	32,3	32,9	32,7	32,6	32,3

FC: frequência cardíaca; FR: frequência respiratória; Tpele: temperatura de pele; apCONT: após contração; apTRAÇÃO: após tração cervical; apIA: após inseminação artificial transcervical

Os valores médios de cortisol PRÉ-IA e PÓS-IA para CONTROLE, AN-1,5 e AN-0,75 foram: $3,5 \pm 1,1$ e $36,7 \pm 4,0$; $3,0 \pm 1,0$ e $50,4 \pm 5,0$; $5,6 \pm 2,3$ e $42,8 \pm 7,6$ nmol/L, respectivamente. Não houve diferença significativa entre TMT ($P > 0,05$), no entanto, observou-se diferença significativa entre MOM e TP ($P < 0,05$), sendo que o nível médio de cortisol sérico PÓS-IA ($42,8 \pm 3,0$) foi sempre maior do que PRÉ-IA ($3,8 \pm 0,8$).

Os valores PRÉ-IA medidos neste estudo, foram inferiores aos valores médios relatados de 55 nmol/L [27, 28] e 17,9 a 29,2 nmol/L [29], dosados em ovinos sem imposição de nenhum tipo de estresse. No caso, esses valores se assemelham mais aos obtidos no momento PÓS-IA. Contudo, Hargreaves & Hutson [27], ao utilizarem a tosquia como agente estressor, observaram um pico muito elevado (200,6 nmol/L) de cortisol. Do mesmo modo, Turner *et al.* [29] também obtiveram altas concentrações de cortisol após impor algum tipo de estresse em ovinos (por exemplo: exercício físico = 105,7 nmol/L; injeção de endotoxina = 202,8 nmol/L e isolamento = 91,6 nmol/L). Esses resultados foram bem superiores aos níveis médios de cortisol encontrados nesta pesquisa no momento PÓS-IA, considerado após o estímulo estressante. Essa diferença de valores provavelmente se deu devido aos trabalhos mencionados acima serem realizados em diferentes países ou até mesmo com diferentes tipos de manejo, visto que o cortisol sofre inúmeras influências, desde estação do ano, idade, clima, sexo, entre outras [30].

A Δ Cort variou significativamente ($P < 0,05$) em função da TP, (Figura 1), $CV = 56,5\%$ e $R^2 = 0,08$. Ou seja, as fêmeas não prenhes (Δ Cort = 48,8 nmol/L) apresentaram variação dos níveis séricos de cortisol maior do que as prenhes (Δ Cort = 28,3 nmol/L) ao final dos procedimentos de IA. Não foi observada interação entre os efeitos fixos TMT*MOM e TMT*TP ($P > 0,05$) sobre os valores séricos de cortisol e o Δ Cort.

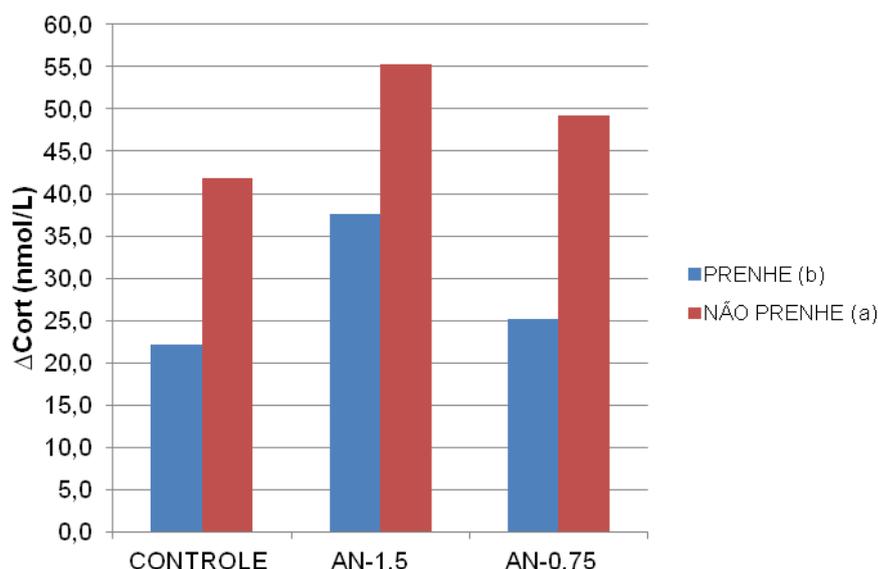


Fig. 1. Diferença dos níveis séricos de cortisol (Δ Cort) entre momentos, ANTES IA e APÓS IA, de acordo com a taxa de prenhez, em ovelhas Suffolk adultas submetidas à inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE), com anestesia subaracnóidea utilizando quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75) (Letras diferentes indicam diferença significativa pelo método de quadrados mínimos, utilizando teste de Dunnett, em nível de 5%)

Embora o nível sérico de cortisol tenha sido significativamente diferente ($P < 0,05$) em relação à TP, os valores médios obtidos para ovelhas prenhes ($18,9 \pm 2,1$ nmol/L) e não prenhes ($27,7 \pm 2,0$ nmol/L), não correspondem ao observado por Macfarlane *et al.* [31] que revelaram que o cortisol somente causa supressão no aumento do estradiol e no pico de LH pré ovulatórios, quando há uma elevação contínua do cortisol plasmático em valores próximos a 207 nmol/L.

A contração abdominal e a facilidade de tração de cérvix variaram significativamente ($P < 0,05$) entre tratamentos. A contração abdominal foi significativamente menos intensa nos animais anestesiados (Figura 2), o que sugere que esses animais reagiram menos à manipulação do que os do grupo CONTROLE, nos quais se constatou a contração abdominal – contrai com tenesmo, em maior frequência (43,3%). Segundo Muir III e Gaynor [32] esse comportamento exibido na forma de maior intensidade de contração é uma demonstração de dor. As variáveis: facilidade de passagem da cérvix e local de deposição do sêmen não apresentaram variações significativas ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

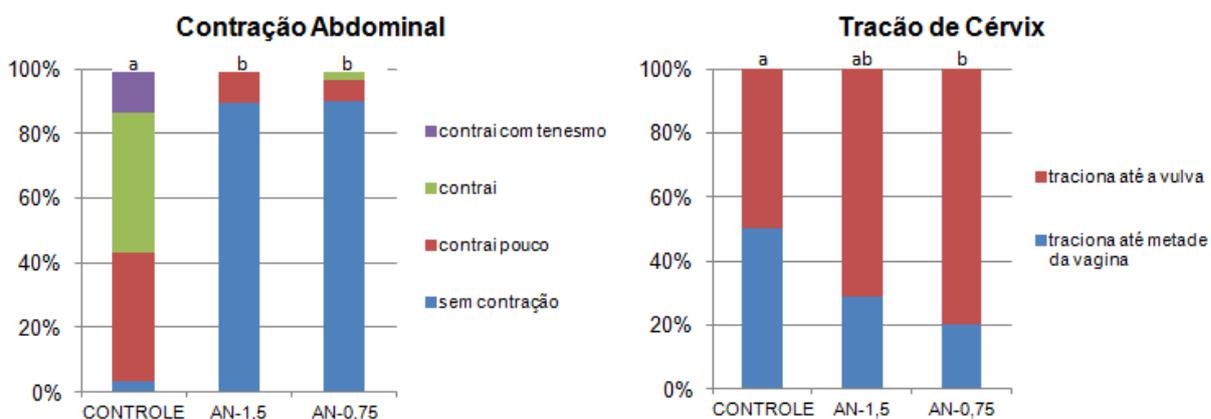


Fig. 2. Ocorrência (%) dos comportamentos de contração abdominal (contraí com tenesmo, contraí, contraí pouco e sem contração) e tração de cérvix (traciona até metade da vagina e traciona até a vulva), em ovelhas Suffolk adultas submetidas à inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE), com anestesia subaracnóidea utilizando quetamina na dose de 1.5 mg/kg (AN-1,5) ou na dose de 0.75 mg/kg (AN-0,75) (Letras diferentes entre tratamentos indicam diferença significativa pelo Teste de Mann-Whitney comparados par a par, em nível de 5%)

Não se observou variação significativa entre tratamentos ($P > 0,05$) de alguns dos comportamentos registrados (características de olhar do animal, ranger de dentes, lamber os lábios e o ato de cheirar tudo) durante os procedimentos de anestesia e inseminação. Já tentativas de fuga, vocalização, movimento de orelha e movimentos de cabeça variaram significativamente ($P < 0,05$) em função do tratamento. Tentativas de fuga e vocalização variaram também de acordo com os subprocessos envolvidos, desde a contenção até a liberação do animal pós-inseminação (Figura 3). As tentativas de fuga apresentaram dispersão de frequência significativamente diferente durante a passagem do espéculo, entre os tratamentos com e sem anestesia (AN-1,5 e AN-0,75 vs. CONTROLE).

Observou-se ainda variação significativa ($P < 0,05$) entre tratamentos na dispersão de frequência de vocalização durante a manipulação do animal, especificamente para passagem do espéculo, pinçamento da cérvix e passagem do aplicador (Figura 3), que mostra maior porcentagem de animais sem vocalização no grupo dos anestesiados. A vocalização é considerada uma importante manifestação de desconforto, já registrada em diferentes espécies, que pode indicar o nível de pânico e comprometimento do bem-estar [33].

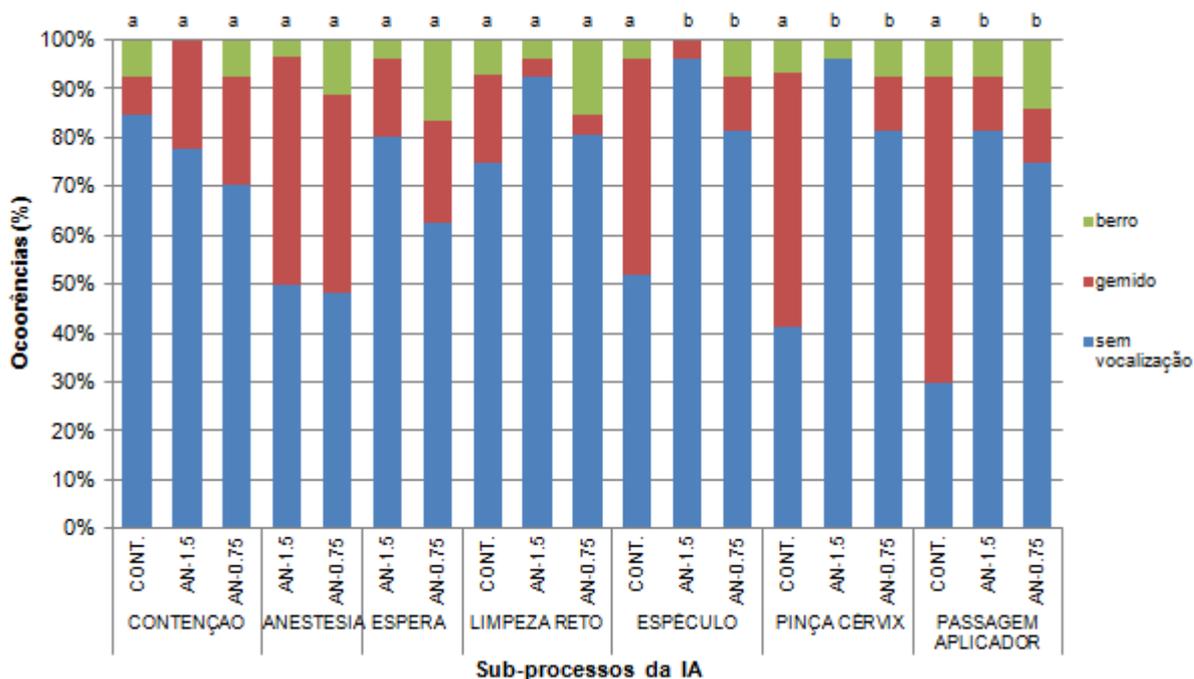


Fig. 3. Dispersão de frequência de vocalização (berro, gemido e sem vocalização) de ovelhas Suffolk adultas durante os subprocessos envolvidos na inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE); inseminação artificial transcervical sob anestesia subaracnóideia com quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75) (Letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos comparados pelo teste de Kruskal-Wallis ou Teste de Mann-Whitney comparados par a par, em nível de 5%)

Com relação aos comportamentos registrados após o procedimento de IA, houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre CONTROLE e os tratamentos com anestesia (AN-1,5 e AN-0,75) somente para posições das orelhas (Tabela 2) e postura (Figura 4).

Tab 2. Frequência média de posições das orelhas observadas após os procedimentos de IA em ovelhas Suffolk adultas submetidas à inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE); inseminação artificial transcervical sob anestesia subaracnóideia com quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75) (Letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos comparados pelo Teste de Mann-Whitney comparados par a par, em nível de 5%)

	CONTROLE (a)	AN-1,5 (b)	AN-0,75 (b)
Para frente	15,7	11,4	11,0
Para trás	10,0	9,3	12,3
Para baixo	1,4	4,1	3,4

Reefmann *et al.* [13] avaliaram posições de cauda e orelhas para predizer reações emocionais em ovinos, e concluíram que mudanças frequentes nas posições das orelhas foram

mais claramente associadas a situações emocionais negativas, e uma alta proporção de posturas “passivas” das orelhas (pendendo frouxamente e balançando junto com qualquer movimento da cabeça) com situações susceptíveis de induzir a estados emocionais positivos. Esses dados corroboram com os obtidos neste estudo (Tabela 2), visto que animais do grupo CONTROLE apresentaram maior frequência de orelhas “para frente” e muito pouca frequência de posição “para baixo” que seria semelhante à posição passiva das orelhas [13], sugerindo que a falta da anestesia causou estado emocional negativo nas ovelhas.

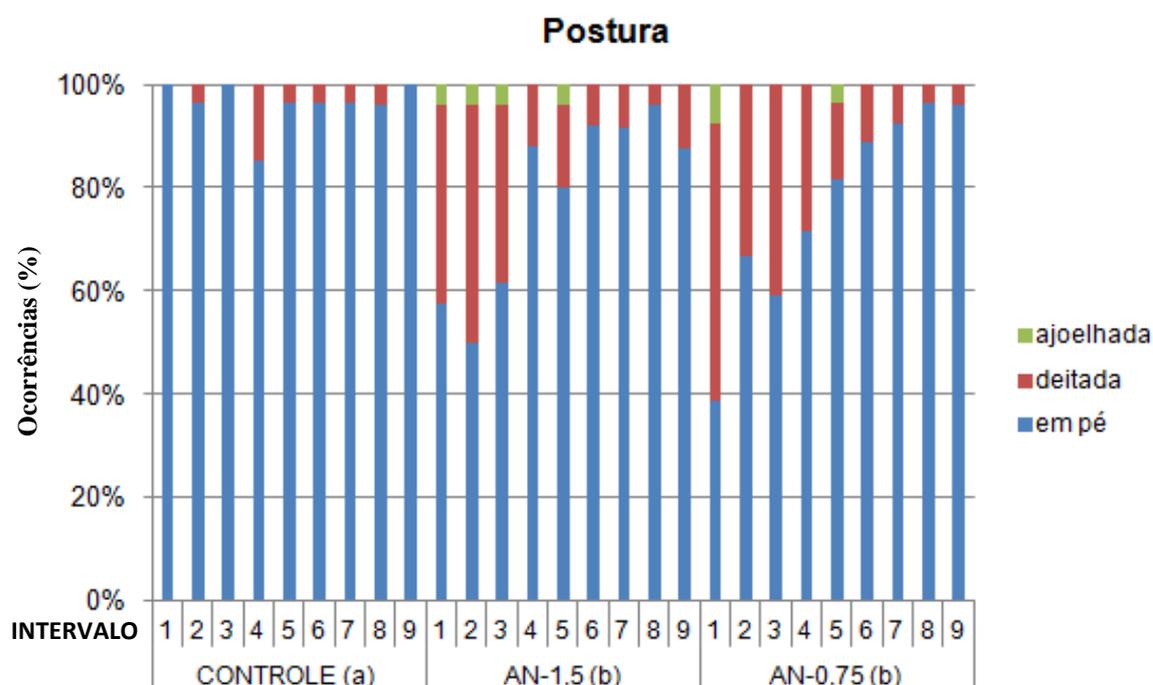


Fig. 4. Ocorrência dos tipos de postura (em pé, deitada ou ajoelhada) em ovelhas Suffolk adultas durante 90 minutos (frações de 10 minutos - 1 ao 9) após o procedimento de inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE); inseminação artificial transcervical sob anestesia subaracnóidea com quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75) (Letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos comparados pelo Teste de Mann-Whitney comparados par a par, em nível de 5%)

A Figura 4 mostra que após 30 minutos, aproximadamente 75% das ovelhas anestesiadas se levantam, comprovando o estudo de DeRossi *et al.* [7], o que contornaria a desvantagem de refluxo de sêmen em razão do relaxamento da cérvix [34]. No entanto, seria interessante e recomenda-se, que após o procedimento de IA, as ovelhas sejam alocadas em cercado pequeno evitando grandes movimentações, pois a anestesia lombo-sacral pode

paralisar os membros posteriores fazendo com que a ovelha não consiga se manter em pé, o que a leva a arrastar-se na tentativa de deslocamento. A imagem que se tem desse momento tem um apelo angustiante do ponto de vista humano, pois sugere sofrimento animal, gerando desconforto entre técnicos e proprietários. Observa-se, deste modo, que a restrição de movimentação física proporciona conforto ao animal e aos humanos.

O tempo médio de procedimento da IA, desde a contenção até a liberação do animal da maca, foi de $13,0 \pm 2,3$; $17,8 \pm 2,2$ e $18,4 \pm 2,2$ minutos para CONTROLE, AN-1,5 e AN-0,75, respectivamente. O tempo de IA foi inferior ($P < 0,0001$) nas ovelhas não anestesiadas, pelo fato de não serem submetidas ao tempo de espera de cinco minutos entre a aplicação da anestesia e o início da IA.

A TP das ovelhas do grupo AN-0,75 foi similar à do AN-1,5 ($P > 0,05$), e este também obteve TP similar ao CONTROLE. No entanto, o AN-0,75 apresentou diferença significativa na TP em relação ao grupo CONTROLE ($P < 0,05$), (Figura 5). Apesar de não ter havido diferença significativa na TP entre os tratamentos AN-1,5 e AN-0,75, foi o tratamento AN-0,75 que apresentou essa taxa maior (66,7%). As médias obtidas nos grupos AN-1,5 e AN-0,75 foram superiores às médias registradas na literatura (40%) em procedimentos similares [1, 5 e 6]. Desse modo, o grupo AN-0,75 agregou 26,7 pontos percentuais na TP em relação aos animais não anestesiados.

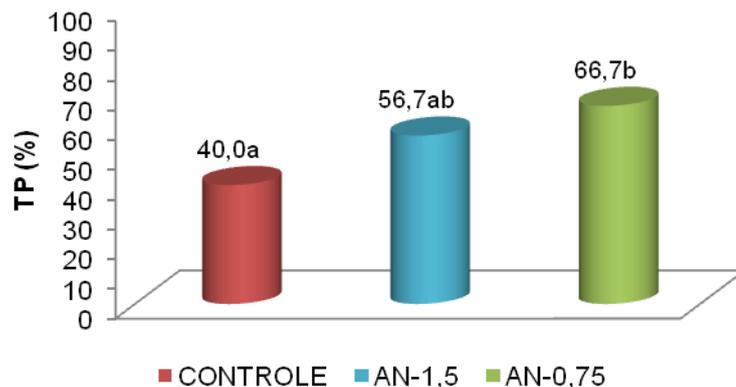


Fig. 5. Taxa de prenhez (TP) de ovelhas Suffolk adultas submetidas à inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE); inseminação artificial transcervical sob anestesia subaracnóidea com quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75). (Letras diferentes indicam diferença significativa entre tratamentos comparados pelo teste de Qui-Quadrado em nível de 5%)

A menor TP no AN-1,5 (56,67%) pode ser hipoteticamente justificada por um possível refluxo do sêmen provocado pelo relaxamento mais prolongado como sugerem Barbas *et al.* [34]. Estes autores após avaliarem o uso de misoprostol associado à terbutalina, onde obtiveram um aumento significativo na dilatação cervical 15 min após a administração dos fármacos, mas diminuição da taxa de fertilidade. Semelhante situação ocorreu no experimento de Sayre e Lewis [35] em que cérvix de ovelhas tratadas com agentes dilatadores permaneceu relaxada por 6 h após a administração desses. Corroborando essas idéias, Wulster-Radcliffe *et al.* [36] afirmaram que o risco de haver refluxo de sêmen ou até mesmo de embrião, aumenta em relação direta com o intervalo de tempo que a cérvix permanecer relaxada.

Em função da contração abdominal (Figura 6), a TP apresentou variação altamente significativa ($P < 0,001$), sendo maior nos tratamentos que receberam anestesia (AN-1,5 e AN-0,75). A TP não variou significativamente entre tratamentos em função de reprodutor, turno da IA, facilidade na passagem da cérvix, local de deposição do sêmen e refluxo ($P > 0,05$).

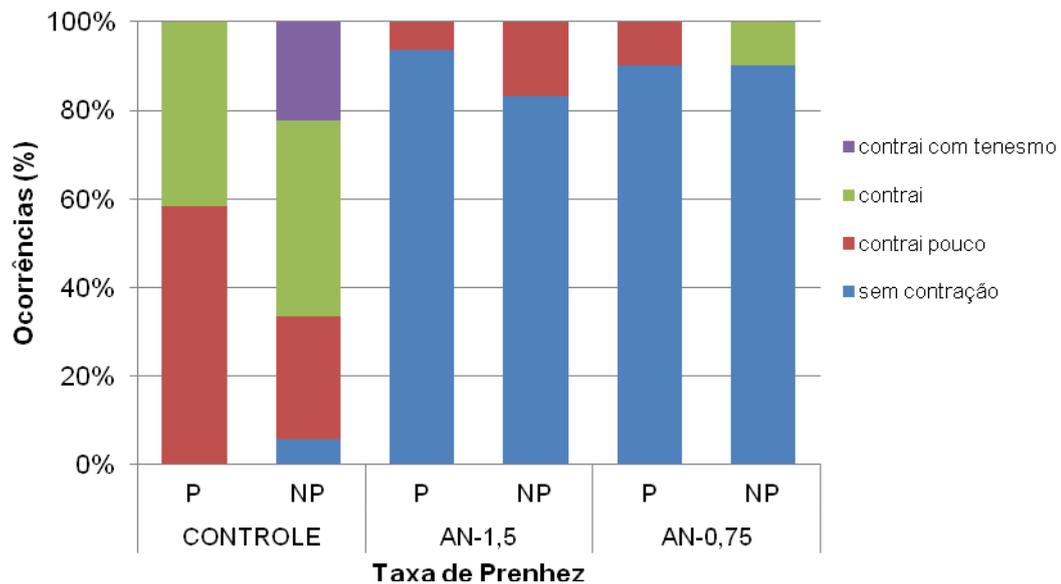


Fig. 6. Dispersão dos escores de contração abdominal (contraí com tenesmo, contraí, contraí pouco e sem contração) de acordo com a prenhez (P: prenhe, NP: não prenhe), de ovelhas submetidas à inseminação artificial transcervical sem anestesia (CONTROLE); inseminação artificial transcervical sob anestesia subaracnóidea com quetamina nas doses de 1,5 mg/kg (AN-1,5) ou 0,75 mg/kg (AN-0,75) (letras diferentes dentro do mesmo tratamento indicam diferença significativa pelo Teste de Kruskal-Wallis em nível de 5%)

4. Conclusão

O uso da anestesia subaracnóidea com quetamina na dose de 0,75 mg/kg em procedimentos de inseminação artificial transcervical com tração em ovinos, facilitou a tração cervical, beneficiou o bem-estar e aumentou a taxa de prenhez.

5. Referências Bibliográficas

- [1] Anel L, Kaabi M, Abroug B *et al.* Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: a field assay. *Theriogenology* 2005;63:1235–1247.

- [2] Milczewski V, Kozicki LE, Luz SLN *et al.* Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. *Arch Vet Sci* 2000;5:35-39.
- [3] Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR *et al.* The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology* 2005;64:1225–1235.
- [4] Anel L, Alavarez M, Martinez-Pastor F *et al.* Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reprod Domest Anim* 2006;41(2):30-42.
- [5] Gündüz MC, Turna O, Cirit Ü *et al.* Lambing rates and litter size following carazolol administration prior to insemination in Kivircik ewes. *Anim Reprod Sci* 2010;118:32-36.
- [6] Rabassa VS, Tabeleão VC, Pfeifer LFM *et al.* Efeito das técnicas transcervical e laparoscópica sobre a taxa de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo-fixo. *Cienc Anim Bras* 2007;8(1):127-133.
- [7] DeRossi R, Carneiro RPB, Ossuna MR *et al.* Sub-arachnoid ketamine administration combined with or without misoprostol/oxytocin to facilitate cervical dilation in ewes: A case study. *Small Rumin Res* 2009;83:74-78.
- [8] Breen KM, Billings HJ, Wagenmaker ER *et al.* Endocrine basis for disruptive effect of cortisol on preovulatory events. *Endocrinology* 2005;146(4):2107-2115.
- [9] Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2ed. São Paulo: Roca, 2008.
- [10] Mies Filho A. *Inseminação Artificial*. 6ed(2). Porto Alegre: Sulina. 1987.
- [11] Nunez CM. Disposição introduzida em mini expansor aplicador cervical de sêmen para cabras, ovelhas e similares. Disponível em <<http://www.patentesonline.com.br/disposicao-introduzida-em-mini-expansor-e-aplicador-cervical-de-sêmen-para-cabras-13709.html>> Acessado em 03 de Nov 2009.
- [12] CBRA - Colégio brasileiro de reprodução animal. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.
- [13] Reefman N, Kaszàs FB, Weschsler B *et al.* Ear and tail postures indicators of emotional valence in sheep. *Appl Anim Behav Sci* 2009;118:199-207.
- [14] Grant C. Behavioural responses of lambs to common painful husbandry procedures. *Appl Anim Behav Sci* 2004;87:255-273.
- [15] SAS – Statistical Analysis System. *User's guide*. Version 6,4.ed. Cary: 1999.
- [16] Siegel S, Castellan Jr. NJ. *Estatística não paramétrica para ciências do comportamento*. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- [17] Sampaio IBM. 1998. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, 1998.
- [18] Reece WO. Respiração nos mamíferos. In: *Dukes: fisiologia dos animais domésticos*. Swenson MJ, Reece WO (11ed.), Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, pp.241-68.
- [19] Teixeira M. Efeito do estresse climático sobre parâmetros fisiológicos e produtivos em ovinos. *Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia)*, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil; 2000.
- [20] Cezar MF, Souza BB, Souza WH *et al.* Validação de parâmetros fisiológicos de ovinos Dorper, Santa Inês e seus mestiços perante condições climáticas do trópico semi-árido nordestino. *Ciênc Agrotec* 2004;28(3):614-620.

- [21] Andrade IS, Souza BB, Pereira Filho JM *et al.* Parâmetros fisiológicos e desempenho de ovinos Santa Inês submetidos a diferentes tipos de sombreamento e a suplementação em pastejo. *Ciênc Agrotec* 2007;31(2):540-547.
- [22] Bezerra WMAX, Souza BB, Sousa WH *et al.* Comportamento fisiológico de diferentes grupos genéticos de ovinos criados no semiárido paraibano. *Rev Caatinga* 2011;24(1):130-136.
- [23] Broom DM, Johnson KG. *Stress and animal welfare*. London: Chapman & Hall, 1993.
- [24] Blanchard RJ, Blanchard DC. Ethoexperimental approaches to the biology of emotion. *Annual Review of Psychology* 1988;39:43-68.
- [25] Aguilar NMA. Avaliação da reatividade de bovinos de corte e sua relação com caracteres reprodutivos e produtivos. Dissertação (Mestrado em Zootecnia, Etologia e Bem-estar animal), Universidade Paulista Julio de Mesquita Filho- UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil; 2007.
- [26] Rueda PM. Alterações comportamentais e hematológicas em vacas Nelore submetidas à protocolo de inseminação artificial em tempo fixo. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Brasil; 2009.
- [27] Hargreaves AL, Hutson GD. The stress response in sheep during routine handling procedures. *Appl Anim Behav* 1990;26(1):83-90.
- [28] Minton JE, Apple JK, Parsons KM *et al.* Stress-associated concentrations of plasma cortisol cannot account for reduced lymphocyte function and changes in serum enzymes in lambs exposed to restraint and isolation stress. *J Anim Sci* 1995;73(2):812-817.
- [29] Turner AI, Rivalland ETA, Clarke IJ *et al.* Stressor specificity of sex differences in hypothalamo-pituitary-adrenal axis activity: cortisol responses to exercise, endotoxin, wetting, and isolation/restraint stress in gonadectomized male and female sheep. *Endocrinology* 2010;151(9):4324-4331.
- [30] Starling JMC, Silva RG, Negrão JA *et al.* Variação estacional dos hormônios tireoideanos e do cortisol em ovinos em ambiente tropical. *R. Bras. Zootec* 2005;34(6):2064-2073.
- [31] Macfarlane MS, Breen KM, Sakurai H *et al.* Effect of duration of infusion of stress-like concentrations of cortisol on follicular development and the preovulatory surge of LH in sheep. *Anim Reprod Sci* 2000;63:167-175.
- [32] Muir III WW, Gaynor JS. Comportamento da dor. In: *Manual de controle da dor em medicina veterinária*. Muir III WW, Gaynor JS. (2ed.), São Paulo: MedVet, 2009, pp.62-77.
- [33] Watts MJ, Stookey JM. Effects of restraint and branding on rates and acoustic parameters of vocalization in beef cattle. *Appl Anim Behav Sci* 1999;62:125-135.
- [34] Barbas JP, Gonçalves SC, Baptista MC *et al.* Effect of vaginal application of cervix dilating agents (misoprostol and terbutalin) on AI results in ovine Portuguese local breeds. *Rev Port Ciênc Vet* 2003;98:185-188.
- [35] Sayre BL, Lewis GS. Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology* 1997;48:267-275.

- [36] Wulster-Radcliffe MC, Costine BA, Lewis GS. Estradiol-17-oxytocin-induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *J Anim Sci* 1999;77:2587–2593.