UNIVERSIDADE SANTO AMARO

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Medicina Veterinária e Bem-estar Animal

Leonardo Almeida Gelio

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS ANESTÉSICOS PARA PREVENÇÃO DO ESTRESSE E DESCONFORTO DOLOROSO ASSOCIADOS À ELETROEJACULAÇÃO EM CAPRINOS

São Paulo

2020

Leonardo Almeida Gelio

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS ANESTÉSICOS PARA PREVENÇÃO DO ESTRESSE E DESCONFORTO DOLOROSO ASSOCIADOS À ELETROEJACULAÇÃO EM CAPRINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal.

Orientador Prof. Dr. André Maciel Crespilho.

São Paulo

2020

LEONARDO ALMEIDA GELIO

AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS ANESTÉSICOS PARA PREVENÇÃO DO ESTRESSE E DESCONFORTO DOLOROSO ASSOCIADOS À ELETROEJACULAÇÃO EM CAPRINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem-estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. André Maciel Crespilho**.**

São Paulo 15 de dezembro de 2020

Banca Examinadora

_____

Prof. Dr. André Maciel Crespilho

_____

Prof. Dra. Andrea Bueno Ribeiro

_____

Prof. Dr. Fábio Morato Monteiro

Conceito Final: _____

Dedico esse trabalho a meu filho Lucas, pois ele sempre será meu maior incentivo para seguir em frente.

Agradecimentos

À Deus, por ter me permitido chegar até aqui, com saúde física e mental, apesar das dificuldades e barreias encontradas.

A minha esposa Vanessa e Minha mãe Lilian que sempre me apoiaram e incentivaram a seguir em frente e serviram de exemplo.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Maciel Crespilho pela orientação, paciência, apoio e auxílio na elaboração e execução deste projeto.

Aos colegas do grupo de pesquisa, pelo auxílio em diversas partes do trabalho.

A UNISA e seus professores pela possibilidade em realizar esse projeto e o ensino desempenhado.

‘’A espantosa realidade das coisas é a minha descoberta de todos os dias. Cada coisa é o que é. E é difícil explicar a alguém quanto isso me alegra, e quanto isso me basta. Basta existir para se ser completo’’

Fernando Pessoa

RESUMO

A eletroejaculação (EE) corresponde a uma técnica que permite a coleta de sêmen de animais domésticos e selvagens, de forma independente à libido ou período de acasalamento de cada espécie. No entanto, o procedimento de EE provoca intensa contração muscular involuntária, esforço, vocalização e decúbito ocasionado pela estimulação aguda da inervação pélvica caudal, manifestações que representam importantes indicadores de desconforto doloroso e estresse animal. Nesse contexto, o objetivo do estudo foi avaliar dois protocolos de bloqueio anestésico local e duas vias de acesso à inervação da região pélvica como alternativas para redução do desconforto e estresse durante a eletrojeculação de caprinos. Para o estudo foram selecionados 7 reprodutores mestiços da raça Anglo-Nubiano. Todos os animais passaram por 5 grupos experimentais para coleta de sêmen: **G1** (grupo controle), eletroejaculação convencional sem bloqueio anestésico local; **G2**, EE com bloqueio ventral da inervação pélvica utilizando cloridrato de lidocaína 2%; **G3**, eletroejaculação com bloqueio ventral da inervação pélvica, utilizando associação de cloridrato de lidocaína 2% e citrato de fentanila; **G4**, eletroejaculação com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando lidocaína 2%; **G5**, EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando associação de lidocaína 2% e citrato de fentanila. Todos os reprodutores passaram pelos 5 tratamentos e com 3 repetições para cada grupo experimental. As amostras espermáticas resultantes da eletroejaculação foram submetidas à análise subjetiva de cinética, morfologia e integridade de membrana plasmática. Antes e após a EE foram avaliadas a pressão arterial, frequência cardíaca (FC), respiratória (FR), além da coleta de amostras de sangue venoso para a quantificação dos níveis de cortisol plasmático e creatinina fosfoquinase (CPK). Como parâmetros comportamentais foi observada a ocorrência de ataxia, vocalização e alteração postural de todos animais após a eletroejaculação. Não foram observadas diferenças ($P<0,05$) para nenhum dos parâmetros de qualidade seminal, ataxia, vocalização, FC e para as concentrações de cortisol quando comparados os diferentes grupos experimentais. Foi necessário menor número de estímulos elétricos para resultar na ejaculação dos animais do G1, que apresentaram menor concentração de CPK plasmático em relação aos grupos tratados. No entanto, maiores valores para a pressão arterial média e diastólica foram associados a pacientes que não receberam bloqueio anestésico previamente à EE. Conclui-se que os bloqueios anestésicos da região pélvica utilizando cloridrato de lidocaína associado ou não ao citrato de fentanila não permitem redução expressiva da dor e desconforto associados à eletroejaculação de caprinos, resultando no aumento do tempo para obtenção dos ejaculados e do número médio de estímulos elétricos necessários para o desencadeamento do processo ejaculatório na espécie.

Palavras-chave: Bloqueio anestésico, bodes, desconforto, eletroejaculação, estresse.

ABSTRACT

Electro-ejaculation (EE) corresponds to a technique that allows the collection of semen from domestic and wild animals, independently of the libido or mating period of each species. However, the EE procedure causes intense involuntary muscle contraction, effort, vocalization and decubitus caused by the acute stimulation of the caudal pelvic innervation, manifestations that represent important indicators of painful discomfort and animal stress. In this context, the objective of the study was to evaluate two local anesthetic block protocols and two access routes to the innervation of the pelvic region as alternatives to reduce discomfort and stress during electro-regulation of goats. For the study, 7 crossbred Anglo-Nubian breeders were selected. All animals went through 5 experimental groups to collect semen: G1, conventional electroejaculation without local anesthetic block; G2, EE with ventral block of pelvic innervation using 2% lidocaine hydrochloride; G3, electroejaculation with ventral block of pelvic innervation, using a combination of 2% lidocaine hydrochloride and fentanyl citrate; G4, electroejaculation with pelvic innervation block through perineal access, using 2% lidocaine; G5, EE with pelvic innervation block through perineal access, using a combination of 2% lidocaine and fentanyl citrate. All breeders went through 5 treatments and with 3 repetitions for each experimental group. The sperm samples resulting from electroejaculation were subjected to subjective analysis of kinetics, morphology and integrity of the plasma membrane. Before and after EE, blood pressure, heart rate (HR), respiratory rate (RF) were evaluated, in addition to the collection of venous blood samples for the quantification of plasma cortisol and creatinine phosphokinase (CPK) levels. As behavioral parameters, the occurrence of ataxia, vocalization and postural changes in all animals after electroejaculation was observed. There were no differences ($P < 0.05$) for any of the seminal quality, behavioral, postural, HR parameters and cortisol concentrations when comparing the different experimental groups. A smaller number of electrical stimuli was necessary to result in the ejaculation of G1 animals, which had a lower plasma CPK concentration compared to the treated groups. However, higher values for mean and diastolic blood pressure were associated with patients who had not received anesthetic block prior to EE. It is concluded that anesthetic blocks in the pelvic region using lidocaine hydrochloride associated or not with fentanyl citrate do not allow a significant reduction in pain and discomfort associated with the electroejaculation of goats, resulting in an increase in the time to obtain ejaculates and the average number of stimuli necessary to trigger the ejaculatory process in the species.

Keywords: Anesthetic block, goats, discomfort, electroejaculation, stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Anatomia do sistema reprodutor masculino em ruminantes.....17

Figura 2: Representação esquemática da inervação da região pélvica e peniana de caprinos. O nervo pudendo se origina das raízes neuronais S2, S3 e S4 e, durante o seu percurso pélvico sofre diversas ramificações. No detalhe da imagem é possível observar duas linhas tracejadas (linhas A e B), que representam áreas de acesso anestésico para o bloqueio das ramificações do nervo pudendo.....19

Figura 3: Via aferente da dor periférica para o sistema nervoso central, dividida em tradução, transmissão, modulação e percepção.....21

Figura 4: Mecanismo de ação dos agentes anestésicos locais, um exemplo de anestésico local (BH) se liga ao canal de sódio próximo à superfície interna da membrana neuronal.....23

Figura 5: Bloqueio da inervação da região ventral peniana.....32

Figura 6: Exemplo do bloqueio anestésico a partir do acesso pela região perineal....32

Figura 7: Monitor multiparamétrico RM1000VET e manguito número 3 e 4 (empregado para monitoração dos caprinos durante a condução dos bloqueios anestésicos EE)..33

Figura 8: Exemplo de coloração supravital utilizando a associação de eosina e nigrosina para determinação da integridade de membrana plasmática. No exemplo, células sem marcação tintorial na região da cabeça representam espermatozoides íntegros; já os espermatozoides com membrana plasmática lesada encontram-se corados em rosa claro.....36

Gráfico 1: Níveis séricos de cortisol mensurados antes (Cortisol Pré) ou após (Pós EEJ) a eletroejaculação de caprinos, de forma independente aos diferentes grupos experimentais.....42

Gráfico 2: Níveis séricos de creatinina fosfoquinase (CPK) mensurada após a eletroejaculação de caprinos, de forma independente aos diferentes grupos experimentais. Onde: Controle: eletroejaculação convencional; Tratamento: eletroejaculação após bloqueio anestésico local.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número médio (±SD) de estímulos elétricos necessários para desencadear o processo ejaculatório em caprinos submetidos à eletroejaculação, de acordo com os diferentes grupos experimentais.....37

Tabela 2: Resultados médios (±SD) da pressão (PA1) sistólica, média e diastólica inicial (antes da eletroejaculação) de reprodutores caprinos alocados em diferentes grupos experimentais.....38

Tabela 3: Resultados médios (±SD) da pressão sistólica, média e diastólica final de reprodutores caprinos alocados em diferentes grupos experimentais.....38

Tabela 4: Média (±SD) da frequência cardíaca avaliada antes (FC INICIAL) ou após (FC FINAL) à eletroejaculação de caprinos, de acordo com os diferentes grupos experimentais.....39

Tabela 5: Média (±SD) da frequência respiratória avaliada antes (FR INICIAL) ou após (FR FINAL) à eletroejaculação de caprinos, de acordo com os diferentes grupos experimentais.....40

Tabela 6: Média (±SD) da vocalização, ataxia e decúbito em relação aos diferentes bloqueios anestésicos de cada grupo experimental. 40

Tabela 7: Valores médios (±SD) para a motilidade espermática total (MT, %), vigor (0 a 5) e volume seminal (ml), de acordo com os diferentes grupos experimentais.....41

Tabela 8: Concentração média (±SD) de cortisol antes (CI) ou após (CF) a eletroejaculação, bem como a diferença (CF-CI) dos níveis desse hormônio entre as duas mensurações realizadas.....48

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	Homônio adrecortocotrófico
ADP	Adenosina disfofato
ATP	Adenosina trifosfato
BEA	Bem-estar animal
CF	Cortisol final
CRH	Hormômonio liberador de corticotrofina
CI	Cortisol inicila
CK	Creatina quinase
CPK	Creatinina fosfoquinase
EE	Eletroejaculação
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
IASP	International Association to study of pain
MPO	Mieloperoxidase
MT	Motilidade
NDT	Nutrientes digestíveis totais
PA	Pressão arterial
PAS	Pressão arterial sistólica
PB	Proteína bruta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....14

1.1 Caprinocultura 14

1.2 Reprodução dos Caprinos 15

1.3 Morfofisiologia da Reprodução do Macho Caprino.....15

1.3.1 Testículos.....16

1.3.2 Epidídimo.....16

1.3.3 Pênis.....16

1.3.4 Glândulas acessórias.....16

1.3.5 Espermatozoides.....17

1.4 Eletroejaculação (EE).....17

1.5 Anatomia dos Órgãos Reprodutivos Internos.....18

1.6 Anatomia do Nervo Pudendo.....19

1.7 Fisiologia da dor.....20

1.8 Bloqueio anestésico.....21

1.9 Lidocaína.....22

1.10 Fentanila.....23

1.11 Neurofisiologia da Ejaculação.....23

1.12 Desconforto e Estresse Relacionados a Eletroejaculação.....24

1.13 Bem-Estar..... 25

1.14 O Hormônio Cortisol.....26

1.15 A Creatina Fosfoquinase (CPK).....27

1.16 Métodos Para Minimizar Dor e Estresse no Procedimento de Eletroejaculação.....28

2 OBJETIVO.....29

3 MATERIAL E MÉTODOS.....29

3.1 Local e Animais.....30

3.2 Grupos experimentais.....30

3.3 Avaliação Multiparamétrica 33

3.4 Determinação do Cortisol e Creatinina Fosfoquinase.....34

3.5 Avaliações do Comportamento.....34

3.6 Análise Seminal.....35

3.6.1 Integridade de Membrana Plasmática.....35

3.7 Análises Estatísticas.....36

4. RESULTADOS.....37

4.1 Eletroejaculação / Estímulo Elétrico..... 37

4.2 Pressão Arterial Inicial.....37

4.3 Pressão Arterial Final.....38

4.4 Frequência Cardíaca.....39

4.5 Frequência Respiratória.....39

4.6 Vocalização, Decúbito e Ataxia.....40

4.7 Motilidade Espermática, Vigor e Volume Seminal.....41

4.8 Cortisol 41

4.9 Creatina Fosfoquinase (CPK).....42

5 DISCUSSÃO.....44

6 CONCLUSÃO.....48

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....49

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura no Brasil é uma atividade de extrema importância, seja no contexto econômico, pela geração de fonte de renda para pequenos produtores, seja no contexto sociocultural, pela fixação do homem ao campo e perpetuação da atividade produtiva para as gerações seguintes (BATISTA, 2015).

De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária EMBRAPA (2018) a caprinocultura vem crescendo em termos quantitativos e qualitativos no Brasil. Para melhorar o crescimento reprodutivo, são empregadas biotecnologias na área de reprodução aliada ao melhoramento genético. O processo ejaculatório pode ser obtido através de metodologias como, a utilização de vagina artificial e monta em manequim, porem alguns fatores podem dificultar a coleta, como o a adaptação do animal doador, treinamento adequado à equipe e necessidade de uma fêmea para que o animal seja induzido a monta (SILVEIRA et al., 2011).

A coleta de sêmen através da eletroejaculação é empregada atualmente devido a facilidade e agilidade do processo, pois dispensa adaptação do bode e treinamento da equipe, porem essa metodologia está sendo banida em alguns países, pois foi relatado em alguns estudos que esse procedimento causa dor e estresse, portanto sua utilização em animais levanta questões de bem-estar (DAMIÁN et al., 2011; SANCHEZ et al., 2018).

O bem-estar animal, vem sendo motivo de preocupação por toda a cadeia produtiva pecuária, exige cada dia mais um produto oriundo de boas práticas de manejo nas propriedades, por esse motivo a eletroejaculação foi banida em alguns países. Neste contexto o efeito da técnica de EE vem sendo questionado, se há necessidade de estratégias para minimizar os efeitos negativos relacionados ao bem-estar animal (NEVES, 2018).

1.1 Caprinocultura

A espécie caprina tem origem asiática, *Capra hircus*. Foi um dos primeiros animais a ser domesticado pelo homem, assim como os ovinos e o cão, há cerca de 12 mil anos; além disso, foi também o primeiro a ser utilizado na produção leiteira (SILVA et al.,2011).

São considerados animais rústicos, com grande rapidez de crescimento, de boa conversão alimentar e adaptação climática. No nordeste do Brasil a caprinocultura representa o maior rebanho brasileiro, sendo explorados produtos e subprodutos, como leite, pele, carne e esterco (SANTANA, 2000; EMBRAPA, 2018).

1.2 Reprodução dos Caprinos

O manejo reprodutivo do rebanho envolve desde a escolha dos machos que serão utilizados para serem acasalados com fêmeas que apresentam melhores características dentro do plantel, acompanhamento dos animais jovens até a idade de reprodução e das fêmeas gestantes bem como os cuidados com as crias após o parto e durante a lactação (GRANADOS et al., 2006).

A puberdade ocorre aproximadamente aos 4 meses de idade quando o macho e a fêmea atingem aproximadamente 40 a 50% do peso vivo adulto; porém é recomendável que o acasalamento se inicie a partir do momento em que os animais atinjam 60 a 75% do peso vivo adulto, sendo chamada essa fase de puberdade zootécnica que ocorre geralmente aos 6-8 meses de vida. As cabras são animais estacionais, manifestando o ciclo em épocas de fotoperíodo decrescente, que corresponde à estação do outono e inverno, quando os dias são mais curtos (SILVA; VALLE, 2018).

O ciclo estral da cabra é caracterizando por diferenças hormonais e pela atividade cíclica dos ovários com duração fisiológica ao redor de 20 a 21 dias, podendo variar com a raça, estado nutricional, presença do macho e clima. A fase do estro (cio), período em que a fêmea aceita o macho e se deixa montar, possui duração de aproximadamente 36 horas, com variação de até 24 a 40 horas (GRANADOS et al., 2006).

1.3 Morfofisiologia da Reprodução do Macho Caprino

1.3.1 *Testículos*

Os testículos possuem duas funções essenciais, a espermatogênese (produção de espermatozoides) e produção hormonal (testosterona). Na espécie caprina os testículos possuem formato ovalado, localizado na bolsa escrotal, que pode apresentar a presença de bipartição. O seu posicionamento é vertical, com peso variando entre 50 e 150 gramas, sendo geralmente simétricos e de consistência fibroeláestica (RICARTE; SILVA, 2010).

1.3.2 *Epidídimo*

O epidídimo é um órgão de formato alongado que se encontra aderido ao testículo. É dividido em três partes denominadas: cabeça, corpo e cauda. A cabeça do epidídimo está aderida ao topo do testículo e a cauda está na parte inferior e pode ser palpada através da parede do escroto. A maturação dos espermatozoides, isto é a aquisição da motilidade e da capacidade de fertilização, ocorre na cabeça e no corpo do epidídimo, enquanto nas células maduras são armazenadas na cauda tem como função armazenar os espermatozoides produzidos pelos testículos (GRANADOS et al., 2006; MAIA; NOGUEIRA, 2019).

1.3.3 *Pênis*

Representa o órgão copulador que possui um prolongamento na extremidade uretral definido como processo ou apêndice vermiforme, que facilita a ejaculação e disseminação do ejaculado no trato reprodutor feminino (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

1.3.4 *Glândulas Acessórias*

São formadas pelas vesículas seminais, bulbouretrais e próstata, e tem como função a produção do plasma seminal, importante na prevenção da sobrevivência dos espermatozoides, como demostrado na (Figura 1) (RICARTE; SILVA, 2010).

1.3.5 *Espermatozoides*

São formados a partir das células germinativas, presentes nos túbulos seminíferos. Desenvolvem-se através das espematogônais que se diferenciam em espermatócitos primários, secundárioa e espermátides, até espermatozoides. Esse processo é chamado de espermatogênese, sendo regulado pela produção de testosterona a partir das células de Leydig (SANTOS et al., 2016).

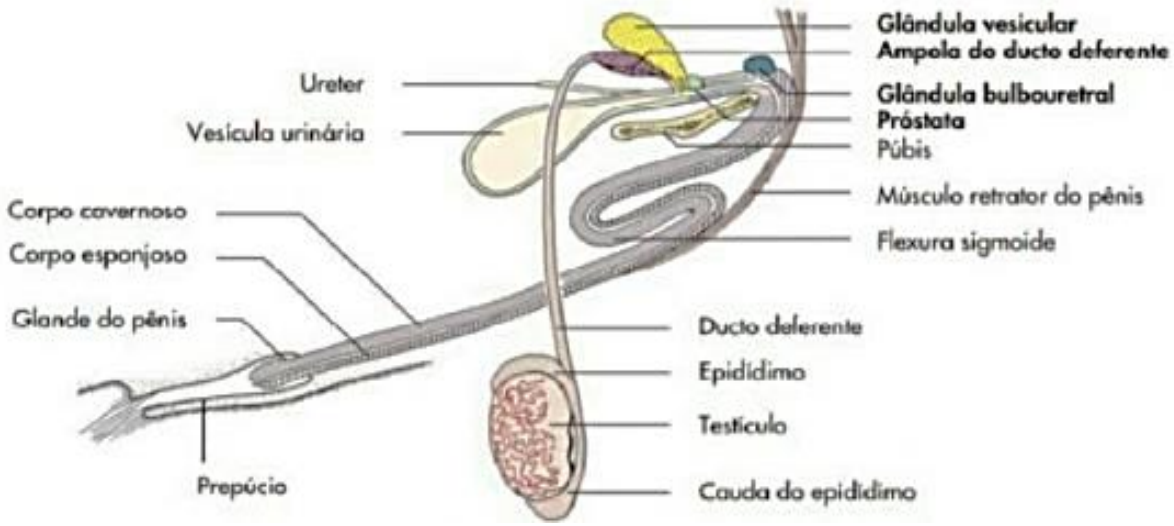


Figura 1: Anatomia do sistema reprodutor masculino de ruminantes. Fonte: (KONIG; LIEBICH, 2016)

1.4 Eletroejaculação (EE)

A eletroejaculação foi desenvolvida como alternativa para a coleta de sêmen dos animais a partir de observações realizadas no início do século XIX, onde pesquisadores da época notaram que a ejaculação ocorria de forma espontânea em seres humanos eletrocutados (SEVERO, 2013).

O uso da eletroejaculação favorece a coleta de sêmen para fins comerciais e o desenvolvimento reprodutivo das diferentes espécies de animais de produção, visando o melhoramento genético dos rebanhos (CARVALHAL; COSTA, 2018). Essa metodologia também pode ser empregada em animais selvagens e tem como objetivo a obtenção de material genético para fins conservacionistas (MARTINEZ et al., 2013).

A metodologia de eletroejaculação consiste na introdução por via retal de um transdutor que emite estímulo de baixa voltagem e corrente, gerando impulsos elétricos que são propagados através de eletrodos metálicos contidos na sonda transretal. O estímulo elétrico induz a ereção do pênis, emissão de sêmen e a ejaculação. Anatomicamente, os impulsos elétricos estimulam ramos nervosos do plexo hipogástrico que se encontram localizados em torno da vesícula seminal, próstata e ducto deferente, induzindo a emissão de sêmen da cauda do epidídimo para a uretra prostática (BRODBELT et al., 2008; BILLE et al., 2012). O uso desse método também resulta em estimulação do nervo pudendo, que possui ramificações inervando a região proximal da uretra, induzindo contrações dos músculos uretrais envolvidos no processo de ejaculação (SANCHEZ et al., 2019).

A técnica de EE possui como vantagens a rapidez e praticidade de execução, permitindo a coleta de sêmen sem a necessidade de adaptação prévia do animal. Além disso, as coletas podem ser feitas em larga escala e em ambiente de campo permitindo, inclusive, a obtenção de amostras espermáticas de animais arredios e agressivos (ALOMAR et al., 2016).

1.5 Anatomia dos Órgãos Reprodutivos Internos

Para realizar a coleta de sêmen é importante que o médico veterinário conheça a localização topográfica não apenas dos órgãos genitais internos, como também dos músculos envolvidos nos mecanismos de emissão, ereção e ejaculação (CAMELA, 2015).

No caso dos ruminantes, os órgãos envolvidos na produção das secreções que formam o plasma seminal representam as ampolas dos ductos deferentes, glândulas vesiculares (também conhecida como vesícula seminal), próstata e glândulas bulbouretrais. Esse conjunto de órgãos, que recebe a denominação de glândulas sexuais acessórias, encontra-se localizado sobre os ossos do ísquio e púbis, abaixo do reto, ocupando toda a extensão longitudinal da pelve. Adjunto as glândulas sexuais acessórias se observam vasos sanguíneos e nervos responsáveis não apenas pela inervação local, como também de parte da musculatura presente nos membros posteriores (SEVERO, 2017). Além disso, parte dessa inervação e vasos sanguíneos locais chegam à musculatura uretral e aos corpos esponjosos e cavernosos presentes

na base do arco isquiático para formação do pênis. Nessa mesma região anatômica e topográfica também se observa a inserção dos músculos retratores do pênis, que se inserem na superfície ventral das primeiras vértebras caudais (RICARTE; SILVA, 2010).

1.6 Anatomia do Nervo Pudendo

O nervo pudendo origina-se das raízes nervosas de S2, S3 e S4; durante seu percurso se ramifica para o músculo coccígeo e os nervos cutâneo proximal, cutâneo distal, uretral, perineal profundo, perineal superficial e dorsal do pênis (Figura 2).

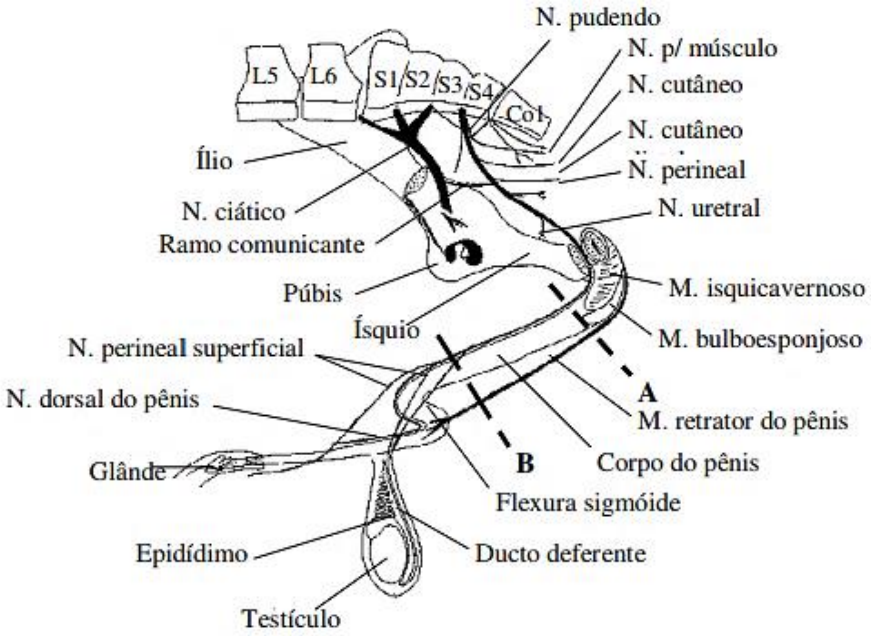


Figura 2: Representação esquemática da inervação da região pélvica e peniana de caprinos. O nervo pudendo se origina das raízes neuronais S2, S3 e S4 e, durante o seu percurso pélvico sofre diversas ramificações. No detalhe da imagem é possível observar duas linhas tracejadas (linhas A e B), que representam áreas de acesso anestésico para o bloqueio das ramificações do nervo pudendo. Fonte: (MARIZ; NETO; SOARES, 2001).

1.7 Fisiologia da Dor

A dor corresponde a uma sensação traumática resultante de respostas físicas e psicológicas (STEEDS, 2016). Em 2020 a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) determinou que a dor pode ser definida como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial”. A dor tem como objetivo alertas ou prevenir o organismo, tornando-se uma defesa frente a uma lesão. Todas as lesões teciduais resultam em efeito doloroso e estimulam o eixo endócrino, aumentando assim os níveis séricos do cortisol e de catecolaminas que estimulam a produção de mediadores inflamatórios, causando aumento da frequência respiratória (taquipnéia), vasoconstrição, diminuição da motilidade intestinal (HELLYER; ROBERTSON; FAILS, 2007). Os processos de ativação da dor podem ser citados como; transdução, transmissão, modulação e percepção (DRUMOND, 2005).

A musculatura, pele, ossos e demais tecidos corporais são formados por várias terminações nervosas. Os receptores de dor, identificados como nociceptores estão na periferia, quando há um estímulo doloroso o mesmo leva a informação aos nervos periféricos, essa fase é conhecida como fase de transdução e está associada aos primeiros neurônios, sendo classificados como receptores; mecânico Aδ, receptor termo mecânico Aδ, receptor C (SMITH, 2018). As fibras aferentes primárias da dor realizam sinapse com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula, sendo denominada fase de transmissão, caracteriza-se pela propagação dos impulsos nervosos pela raiz dorsal do nervo espinhal. Os tratos espinotalâmicos e espinorreticulares aferentes conduzem a dor até o cérebro, onde os sinais dolorosos são processados pelo tálamo e enviados ao córtex. A via eferente, chamada de via cinza periaquadutal do mesencéfalo e núcleo magno da rafe, possuem um papel na modulação da dor. Tais mecanismos envolvem sensibilização periférica e central (ORLANDO, 2011). Assim sendo, ocorre a percepção da dor pelo córtex cerebral iniciando estímulo descendente que será modulado como demostrado na (figura 3).

Esse mecanismo endógeno de modulação da dor é importante, pois propicia aumento da sobrevida em todas as espécies (PATEL; KOPF, 2010).

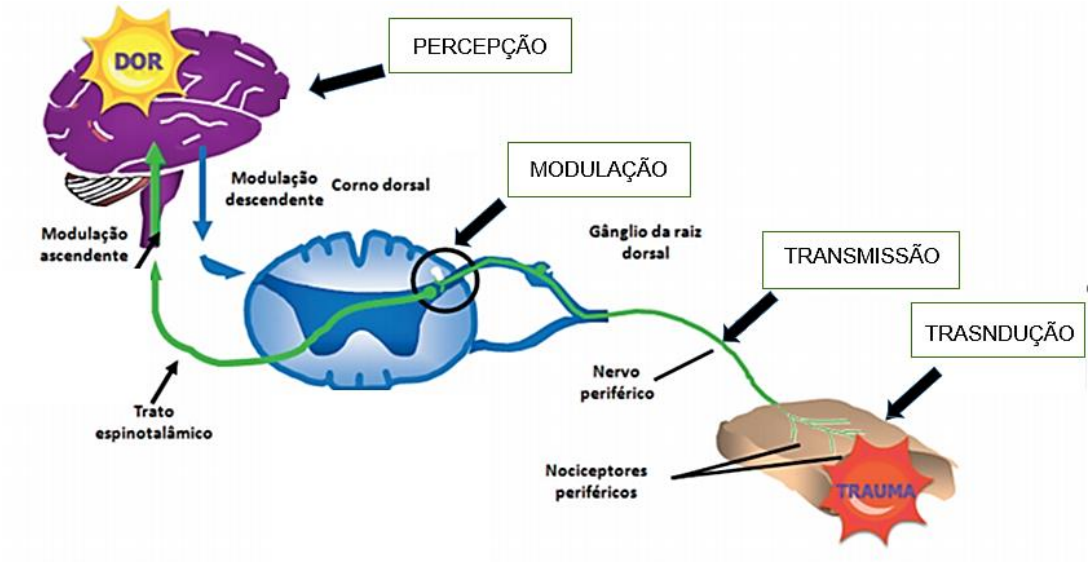


Figura 3: Via aferente da dor periférica para o sistema nervoso central, dividida em tradução, transmissão, modulação e percepção. Fonte: adaptado de (GOTTSCHALK; SMITH, 2001).

1.8 Bloqueio Anestésico

A inibição do processo de condução da excitação nos nervos periféricos pode ser alcançada através da ação farmacológica primária dos agentes anestésicos locais. Em diversas espécies animais são empregadas técnicas de bloqueio anestésico local para condução das mais variadas abordagens clínico-cirúrgicas (BARBOSA et al., 2015).

A membrana celular neuronal se encontra em potencial de repouso em -70mV; para que essa condição se estabeleça é necessário que a concentração de íons sódio e potássio permaneça em equilíbrio, gerando um meio extracelular positivo e intracelular negativo. Esse gradiente de concentração é mantido através de mecanismos relacionados a bomba de sódio e potássio celular. Se houver um estímulo a membrana sofre despolarização, gerando assim um impulso nervoso (BERNINGER et al., 2018).

A ação dos anestésicos locais é inibir reversivelmente o processo de excitação e condução do impulso nervoso ao longo das fibras. Esse efeito acontece devido a inibição de entrada de íons no canal de sódio; sendo assim, não ocorre a

despolarização de membrana e a condução do impulso nervos (EAPPEN; DATTA, 1998).

As ações dos anestésicos locais podem ser classificadas em duas categorias: a que atribui o efeito anestésico à ligação destes compostos ao canal de sódio e a que considera a interação dos anestésicos locais com os componentes lipídicos da membrana (conhecida como "hipótese do lipídio") como determinante para o fechamento dos canais de sódio (ARAUJO et.al; 2008). O fármaco anestésico hidrofóbico tem o acesso pela membrana plasmática e bainha de mielina, ou seja, não necessita da abertura dos canais de sódio, sendo assim o bloquei anestésico não será prejudicado, já o fármaco hidrofílico necessita da abertura dos canais iônicos para, assim bloquear a despolarização da membrana, como forme ilustrado na (Figura 4) onde o anestésico local se liga ao canal de sódio próximo à superfície interna da membrana neuronal, impedindo a condução do estímulo sensorial.

1.9 Lidocaína

A lidocaína é o agente anestésico local mais utilizado na Medicina Veterinária. Sua estrutura farmacológica é do tipo amida, seu pKa é de 7,7 o que lhe oferece um período de latência relativamente curto (5 a 15minutos). Comercialmente seu pH é de 6,78 sem adição de adrenalina e quando associada o reduz em 2 a 2,5 unidades. Assim, tem alto poder de penetração com potência e duração de ação moderadas 60 a 120min. A sua utilização é vasta, podendo ser empregada em bloqueios perineurais, infiltrativos, pelas vias intra-articulares, intravenosa e bloqueios locorregionais nas diversas espécies animais, bem como por meio de patch cutâneo (GONZAGA, 2016). No bloqueio anestésico foi utilizado lidocaína a 2% na dose de 2,5mg/kg em ruminantes (CUNHA, 2011).

1.10 Fentanila

A fentanila representa um opioide de alta potência analgésica e lipossubilidade, sendo um agonista de receptores (MPO); sua potência é aproximadamente 100 vezes mais forte que a morfina. Possui um curto período de latência e ação, sendo utilizada por infusão continua no período transoperatório para o controle da dor e, também, no bloqueio epidural, apresentando duração de ação de aproximadamente 4-5 horas. Já na apresentação na forma de adesivos trasdémicos (absorção cutânea), sua aplicação deve ser realizada com 12 horas de antecedência, e seu efeito analgésico pode durar até 72 horas. Para bloqueio anestésico foi utilizado cloridrato de fentanila, podendo ser utilizado nas doses que variam de 1 mcg/kg (por via IV) a 2,5mcg/kg (via trasdérmica) em ruminantes (SILVA et al., 2018; BURKE et al., 2017; CUNHA, 2011). No presente estudo foi utilizado a dose de 0,8mcg/kg.

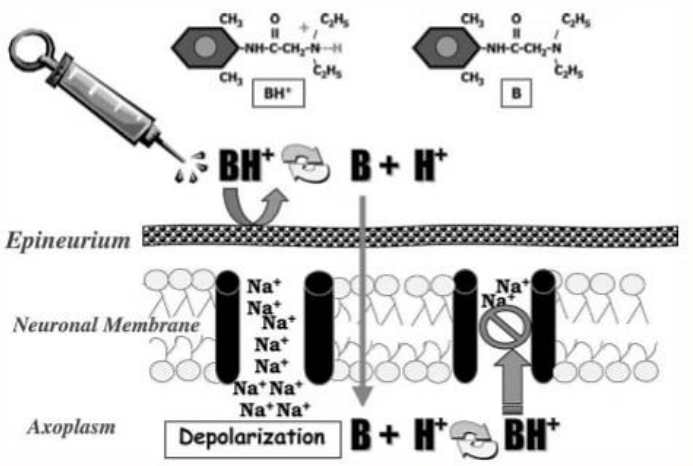


Figura 4: Mecanismo de ação dos agentes anestésicos locais, um exemplo de anestésico local se liga ao canal de sódio próximo à superfície interna da membrana neuronal. Fonte: (BECKER; REED, 2006).

1.11 Neurofisiologia do Processo Ejaculatório

A ejaculação representa um processo fisiológico que ocorre em duas etapas. Na primeira fase ou estágio de emissão (1) o sêmen é expelido a partir dos ductos deferentes e das ampolas para a uretra pélvica, junto com os fluidos secretados pelas glândulas sexuais acessórias. Esta fase é mediada pelo sistema nervoso simpático. A

2ª etapa corresponde a fase ejaculatória onde o sêmen é conduzido através da uretra pélvica graças a contrações dos músculos uretrais e bulbo-esponjosos, chegando à uretra peniana para expulsão. Esta fase é mediada pelo sistema nervoso parassimpático (SALISBURY et al., 1978).

Os nervos associados ao processo de emissão e ejaculação são diferentes e encontram-se localizados em pontos distintos da cavidade pélvica. A fase de emissão é controlada pelos nervos simpáticos (hipogástricos) que estão localizados na parte anterior da pélvis, sobre as ampolas e glândulas vesiculares. A estimulação desses nervos causa emissão do sêmen, porém não provoca a ereção. Os nervos que resultam na ereção encontram-se localizados na parte mais caudal da pelve e se originam nos nervos sacrais, sendo assim, nos nervos pudendo e hemorroidal (GIULIANO, 2011).

Nesse contexto, em virtude da topografia anatômica dos nervos responsáveis pela emissão e ejaculação do sêmen, que se encontram próximos a importantes nervos motores, como o ciático e obturador, é que se questionam os aspectos relacionados ao bem-estar de animais submetidos à eletroejaculação. Durante a EE grandes músculos dos membros pélvicos sofrem desnecessária estimulação nervosa, resultando em estresse, desconforto e ataxia, ao mesmo tempo em que se estimulam os nervos da emissão, ereção e ejaculação do sêmen (SEVERO, 2017).

1.12 Desconforto e Estresse Relacionados a Eletroejaculação

Dentre as várias técnicas utilizadas para a coleta de sêmen em animais de produção, a eletroejaculação ainda se destaca como método mais utilizado. Embora se considere que o método seja extremamente eficaz na indução da emissão de sêmen, seus efeitos dolorosos e estressantes relacionados à estimulação neuromuscular periférica tem sido a justificativa para que diversos países do Mundo tenham optado por banir a EE da prática clínica e dos estudos científicos envolvendo coleta de sêmen (SEVERO, 2017).

Diversos estudos anteriores demonstraram alteração de importantes parâmetros fisiológicos em animais submetidos à EE, como elevação das concentrações séricas de cortisol e proteínas plasmáticas totais, glicemia,

temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória (SANCHEZ et al., 2018). Além disso, a técnica de eletroejaculação pode aumentar as concentrações plasmáticas de creatina fosfoquinase (DAMIÁN; UNGERFELD, 2011; SANCHEZ; et al., 2017), enzima que corresponde a um importante marcador de lesões musculares demostrando, portanto, o estresse e desconforto ocasionado pela EE (AKTAS; et al., 1993).

1.13 Bem-Estar

Na década de 60, a União Europeia passou a estudar os sistemas de produção animal e a exigir a criação animal de modo humanitário. De acordo com estudos anteriores, a preocupação com o Bem-Estar (BEA) ganhou força através da concepção de que os animais são seres sencientes e que o BA só pode ser garantido se fatores como sentimento e comportamento animal forem considerados durante o estabelecimento das diferentes estratégias de manejo animal (PETERS; BARBOSA; PEREIRA, 2010; SILVEIRA et al., 2011; BOND; et al., 2012).

Nesse contexto, considerando que “bem-estar” representa o estado de um indivíduo em relação ao seu ambiente, isso pode ser observado quando há um fracasso na vivência do ambiente, comprometendo os níveos do bem-estar. Esses indicadores incluem, baixa expectativa de vida, crescimento prejudicado, redução na taxa reprodutiva, danos corporais, doenças, imunodepressão por atividade adrenal, anomalias de comportamento (BROOM, 1991).

Há muitas práticas de manejo que causam estresse e são inevitáveis na rotina de uma fazenda, tais como vacinações, manejo de curral e marcação dos bovinos. No entanto, fatores potencializadores de estresse como agressão, gritos e uso de choques elétricos para condução dos animais devem ser evitados (RUEDA; PARANHOS DA COSTA, 2010).

A reprodução é um dos processos que mais sofre com o baixo nível do bem-estar, no entanto é difícil de ser identificada, já que raramente leva a distúrbios de infertilidade e sim a subfertilidade (COSTA; SILVA et al., 2010).

1.14 O hormônio Cortisol

O hormônio cortisol está relacionado diretamente ao estímulo estressante. Sua produção é pelas glândulas adrenais que exercem uma função vital no funcionamento normal do corpo, sendo responsáveis por secretarem alguns tipos de hormônios fundamentais para o estado de homeostase corporal, dentre eles o cortisol que desempenha atividades fisiológicas importantes no organismo (GONZALEZ; et al, 2017).

O córtex adrenal é subdividido em três partes, representadas pela zona glomerulosa, zona fasciculada e zona reticulada. Cada uma dessas partes secreta um tipo específico de hormônio, sendo que os mineralocorticoides são secretados pela zona glomerulosa, os glicocorticoides pela zona fasciculada e os androgênios pela zona reticulada (CUNNINGHAM, 2014). A zona glomerulosa é a primeira camada que compõem a glândula adrenal, ela é composta por uma camada fina de células e são as únicas que tem a capacidade de liberarem o hormônio aldosterona em maior quantidade, isso porque apresentam a enzima aldosteronasintase. A zona fasciculada compreende a segunda camada de células das glândulas adrenais, sendo essa a mais larga representando aproximadamente 75% do córtex adrenal, ela secreta os hormônios cortisol, corticosterona e em menor quantidade os androgênios e estrogênios adrenais sendo a liberação desses hormônios regulada principalmente pelo hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) através do eixo hipotalâmico-hipofisário. E a zona reticular representa a terceira camada de células ou a camada mais interna do córtex das glândulas sendo responsável por liberar os andrógenos adrenais, além de estrogênios e glicocorticoides em pequenas quantidades (MATTERI; CARROLL; DYER, 2000)

Os animais podem reagir diferentemente em relação aos estímulos ambientais, isso irá depender do temperamento, que poderá ser definido como a percepção e reação a estímulos que se originam em situações de desconforto ou ameaça, tanto do ambiente como de manejo. O animal pode desencadear uma resposta emocional que se manifesta por mudanças comportamentais, provocando alterações fisiológicas, denominadas de estresse; sendo assim será iniciada a liberação catecolaminas (adrenalina e noradrenalinae) e, posteriormente, dos glicocorticóides representados pelo cortisol e corticosterona (MONK; et., al 2019).

O cortisol é antagonista fisiológico da insulina promovendo a quebra de moléculas de carboidratos, lipídios e proteínas, para preservar a maior quantidade possível de calorias, configurando o efeito hiperglicemiante (Glineogênses) (KNOTT; et,al., 2010).

A regulação o da secreção de cortisol se dá pelo hormônio adenocorticotrófico (ACTH). Inicialmente o hipotálamo secreta CRH (hormônio liberador de corticotrofina), que pelo sistema de vasos porta-hipotalâmicos-hipofisários atinge a adenohipófise para estimular a produção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). O CRH funciona como neurotransmissor ativando a liberação do ACTH. O ACTH, por sua vez, atinge o córtex da glândula adrenal, esta última responsável pela síntese do hormônio cortisol. Sua natureza é pulsátil, portanto há quantidades diferentes ao longo das horas (RIEK, 2019). A maior intensidade do nível de cortisol sérico são as 8 horas da manhã já a sua menor concentração ocorre durante a noite e em torno da meia noite. (HERNANDEZ et al., 2014).

1.15 A Creatina Fosfoquinase (CPK)

A CPK, também conhecida como creatina quinase (CK) é uma enzima produzida por diferentes tipos celulares, considerada um dímero com massa molecular de aproximadamente 40 kDa, formada pela junção de duas subunidades chamadas M e B (muscular e cerebral respectivamente) (TOTSUKA et al., 2002). A partir das combinações das subunidades podem ser formadas três diferentes isoenzimas, chamadas de CPK1 (BB), CPK2 (MB) e CPK3 (MM), sendo assim é uma fosfotrasferase que está envolvida no processo de armazenamento de energias dos tecidos, principalmente em músculo cardíaco, esquelético e também no sistema nervoso central (EBBELING; CLARKSON, 1989).

Como toda enzima a CPK possui características catalisadoras, ou seja, realiza a transferência do radical fosfato da molécula da adenosina trifosfato (ATP) para um receptor, no caso a molécula da creatinina, formando a creatinina fosfato ou fosfocreatina e adenosina difosfato. Esta reação da enzima CPK é reversível, desta maneira, a CPK também catalisa a fosforilação do ADP por fosfato de creatina,

obtendo-se creatina e ATP, disponível para a contração muscular (MUJIKA et al., 2004)

O aumento sérico de CPK está relacionada a lesões musculares, podendo ser por esforço físico ou doença como a rabdomiólise e necrose. O pico de concentração sérica de CPK se dá 4 a 6 horas após a ocorrência do exercício e os valores podem voltar à normalidade após 24 a 96 horas. Assim altas taxas séricas de CPK indicam afecções musculares ativa ou de ocorrência recente. (MATTOSINHO et al., 2017).

1.16 Métodos Para Minimizar Dor e Estresse no Procedimento de Eletroejaculação

Estudos recentes têm abordado a utilização de bloqueios anestésicos, uso de anestesia geral ou sedação como alternativas metodológicas para promoção de maior conforto durante a EE. De acordo Sanchez et al., (2018), geralmente a prática de sedação ou anestesia diminuiu as respostas ao estresse, sendo capaz de melhorar a qualidade do sêmen dos animais submetidos à EE.

Em outro estudo conduzido pelo mesmo grupo de pesquisa foi avaliada a aplicabilidade da massagem das glândulas sexuais acessórias como alternativa à eletroejaculação. Segundo Sanchez et al., (2019), embora tenha sido observado a diminuição do estresse e desconforto associados à coleta do sêmen por massagem, maior tempo para promoção da ejaculação e necessidade de treinamento de pessoal para conduzir a técnica limitam a adoção desse método em substituição a EE.

Como alternativas metodológicas para diminuição do desconforto associado à EE, Mariz, Neto e Soares (2001) testaram o uso de diferentes técnicas de bloqueios anestésicos em caprinos. De acordo com os autores, o bloqueio anestésico a base de lidocaína 2%, depositada caudalmente à flexura sigmóide do pênis, mostrou-se eficiente por permitir a utilização de menor quantidade de anestésico, possuir maior facilidade de acesso, sendo uma área adequada para o bloqueio do nervo pudendo, promovendo o consequente relaxamento peniano.

Em recente estudo foram realizados outros dois protocolos anestésicos, envolvendo sedação a base de cetamia e xilazina ou anestesia geral em caprinos

submetidos à eletroejaculação. De acordo com os autores, ambos os protocolos proporcionaram diminuição do estresse (discretas alterações na frequência cardíaca e respiratória, no hematócrito, concentração de proteínas totais e de albumina) e da manifestação de vocalização, associado à melhora da qualidade espermática das amostras colhidas através de eletroejaculação. Embora resultados semelhantes de prevenção do estresse e desconforto tenham sido obtidos com anestesia geral e sedação associados à EE, a sedação possui vantagens em comparação ao primeiro método, incluindo manutenção da coordenação motora do animal após os procedimentos de coleta de sêmen (evitando traumas por quedas e acidentes decorrentes de pisoteamento), menor risco anestésico e de óbitos relacionados à anestesia, além de melhor qualidade das amostras espermáticas recuperadas à partir de animais sedados (SANCHEZ et al., 2018).

O emprego de anestésicos locais em região peridural foi testado em 8 touros Nelore de 30 meses submetidos a EE (PAGLIOSA et al., 2015). Nesse trabalho foi observado que a associação de xilazina e hialuronidase para o bloqueio peridural reduziu o desconforto durante Eletroejaculação, sendo mais eficaz do que o emprego isolado de xilazina ou lidocaína.

2 OBJETIVO

O trabalho tem por objetivo a avaliação de duas vias para bloqueio local da inervação pélvica, utilizando lidocaína 2% de forma isolada ou em associação com cloridrato de fentanila, sobre parâmetros de qualidade espermática, parâmetro fisiológico, perfil hormonal e comportamental de caprinos submetidos à EE, relacionados ao desconforto e estresse.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e Animais

Para o estudo foram selecionados 7 reprodutores caprinos mestiços Anglo Nubiano, com idade entre 3 a 7 anos com variação de peso entre 30 a 63 kg, clinicamente sadios e sem histórico de doenças anteriores. Todos os animais foram alojados nas dependências da mini fazenda pertencente ao Hospital Veterinário da Universidade Santo Amaro (HOVET-UNISA), São Paulo, Brasil. Os reprodutores foram mantidos em baia coletiva, respeitando-se lotação máxima de 2,5m^2/animal, sendo todos os procedimentos experimentais previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Santo Amaro, UNISA, São Paulo, Brasil (parecer n. 24.1/2019).

Todos os caprinos foram submetidos ao mesmo manejo nutricional ao longo do período experimental, com dieta composta por feno de tifton (2 a 3kg animal/dia) e ração farelada produzida no local (300g animal/dia) composta por 47% de farelo de soja tostado (46% de proteína bruta, PB), 50% de milho triturado e 3% de suplemento mineral para pequenos ruminantes, totalizando 25% de PB e 85% de NDT, além de água *ad libitum*.

3.2 Grupos Experimentais

Para testar o efeito de diferentes protocolos de bloqueio anestésico da região pélvica, condizente com o trajeto topográfico esperado para ramificações de importantes nervos, como o pudendo, ciático, hemorroidal e obturador foi empregado 5 grupos experimentais envolvendo coleta de sêmen através de eletroejaculação. Para a EE foi utilizado o modo automático do equipamento modelo Neovet® Autojac V3, no qual o próprio aparelho realizava sequência de 5 segundos de estimulação seguidos de 5 segundos de repouso, sempre respeitando a intensidade média de estímulos. A divisão dos grupos foi estabelecida conforme exemplificações abaixo:

- **G1**: Eletroejaculação convencional sem bloqueio anestésico local;

- **G2**: EE com bloqueio realizado a partir da região ventral da inervação pélvica, utilizando como anestésico cloridrato de lidocaína 2% na dose de 2,5mg/kg;

- **G3**: Eletroejaculação com bloqueio ventral da inervação pélvica, utilizando a associação na mesma seringa de cloridrato de lidocaína 2% e citrato de fentanila, respectivamente nas doses 2,5 mg/kg e 0,8mcg/kg por via ventral peniana;

- **G4**: Eletroejaculação com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando lidocaína 2% na dose de 2,5mg/kg;

- **G5**: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando associação na mesma seringa de lidocaína 2% e citrato de fentanila, respeitando-se as mesmas dosagens do G3.

Como cuidados pré-experimentais foram realizadas as tricotomias ventrais e perineais (acesso para condução dos bloqueios anestésicos) e da região cervical (para as coletas de sangue) nos dias que antecederam as coletas de sêmen, prevenindo a ocorrência de fatores estressantes adicionais que pudessem interferir nos resultados.

Para antissepsia da pele nos locais onde foram conduzidos os bloqueios nervosos foi utilizada solução de álcool iodado e após a aplicação eram aguardados 10 minutos para assim obter a latência anestésica. Para condução do bloqueio da inervação da região ventral peniana (Figura 5) foi utilizado seringa de 20ml e agulha hipodérmica 25x8. Já para a realização do bloqueio da região perineal foi utilizado cateter 18G e seringa de 20ml (Figura 6). Os grupos G3 e G5 receberam a lidocaína + fentanila associadas na mesma seringa. Todos os animais passaram primeiramente pelo grupo 1, seguindo pelos demais grupos em ordem crescente (respectivamente, G1 a G5), sendo utilizado o mesmo delineamento experimental para as 3 replicatas. Da mesma forma, foi padronizada a mesma ordem de coleta dos animais (identificados de 1 a 7) em todos os grupos experimentais e em cada uma de suas repetições.

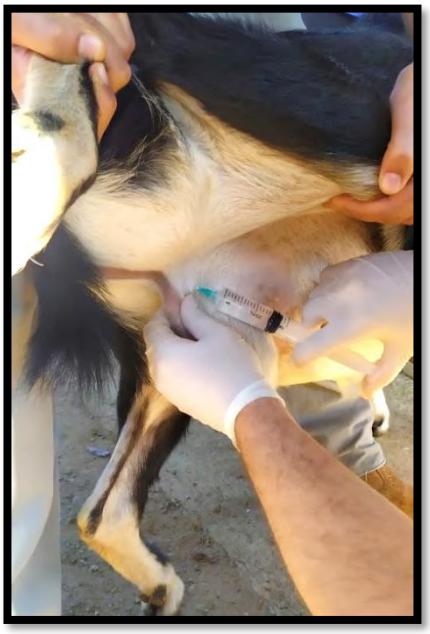


Figura 5: Bloqueio da inervação da região ventral peniana. Fonte: O Autor (2020).

Figura 6: Exemplo do bloqueio anestésico a partir do acesso pela região perineal. Fonte: O Autor (2020).

Os 7 reprodutores caprinos foram submetidos aos 5 grupos experimentais (n=3 coletas por grupo) e as amostras espermáticas foram utilizadas para avaliação cinética, morfológica e estrutural, conforme exemplificam os tópicos abaixo. Adicionalmente foram colhidas amostras de sangue para condução de ensaios

bioquímicos e hormonais, de acordo com cada grupo experimental. As coletas foram realizadas em duas etapas: a primeira obtida imediatamente após a retirada do animal de sua baia (pré eletroejaculação) e a segunda ao final do processo ejaculatório (pós EE).

3.3 Avaliação Multiparamétrica

A pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) foram avaliados através de monitor multiparamétrico (Figura 7) fabricado pela empresa RZ equipamentos veterinários no Brasil (São Paulo/SP), empregando manguito número 3 (animais menores) e 4 (animais maiores), posicionados no membro torácico de cada animal.

Figura 7: Monitor multiparamétrico RM1000VET e manguito número 3 e 4 (empregado para monitoração dos caprinos durante a condução dos bloqueios anestésicos e EE). Fonte: O Autor (2020).

A frequência respiratória (FR) foi aferida a partir observação visual dos movimentos respiratórios de cada animal, sendo contado os movimentos respiratórios por minuto. Os parâmetros fisiológicos descritos acima (FR, FC e PA), foram obtidos antes dos bloqueios anestésico e eletroejaculação, sendo aferidos novamente logo após a EE.

3.4 Determinação do Cortisol e Creatinina Fosfoquinase (CPK)

Amostras de sangue para determinação de cortisol plasmático foram obtidas em dois momentos, antes da aplicação do bloqueio anestésico local e da EE, e após a coleta do sêmen por eletroejaculação, em todos os grupos experimentais. As coletas de sangue foram conduzidas mediante punção da veia jugular, utilizando sistema Vacutainer® e tubos a vácuo de 10 mL com ativador de coágulo. Todas as coletas de sangue foram conduzidas durante o período matutino, respeitando-se um intervalo máximo de até 4 horas entre o primeiro e último animal a ser coletado.

Após a obtenção do sangue as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 2500xg. Após a centrifugação, o soro foi dividido em alíquotas e acondicionado em tubos descartáveis modelo Eppendorff® de 1,5 ml, identificados e armazenados a -18ºC até o momento das análises.

A dosagem de cortisol plasmático foi quantificada segundo técnica descrita por OBA et al. (2006), empregando a técnica de radioimuensaio (Bechman Coulter, Indianápolis, USA. Para essa análise o coeficiente de variação intra e interensaio foi de 5,6% e 7,9%, respectivamente.

Já a determinação da concentração sérica de CK foi realizada seguindo o método descrito por Lopes et al. (2005), utilizando o reagente Laborlab® CK NAC (Guarulhos, Brazil). O valor da atividade da enzima foi obtido através de resultado emitido por analisador bioquímico semiautomático Bioplus® BIO-200, utilizando filtro de 340nm. Os resultados foram expressos em U/L.

3.5 Avaliações do Comportamento

Os animais foram avaliados individualmente e em a cada grupo experimental para a manifestação de vocalização, ataxia e decúbito durante a imediatamente após o processo de eletroejaculação. Para a vocalização foi atribuída pontuação em escala de 0 a 3 pontos, onde 0 representou ausência de vocalização, 1 vocalização de baixa intensidade, 2 vocalizações média e 3 vocalizações de alta intensidade e amplitude. Já a ataxia e decúbito foram considerados como variáveis binárias, recebendo pontuação 0 (ausência) ou 1 (ocorrência) ao longo do processo de EE, ou seja, animais que apresentam postura de prece e andar cambaleante eram jugados como

1 (Ocorrência de ataxia) e aqueles que ficassem em decúbito esternal ou lateral eram considerados 1 (ocorrência de Decúbito).

3.6 Análise Seminal

O sêmen resultante da eletroejaculação foi avaliado subjetivamente no ato da colheita quanto ao volume seminal (frasco de coleta graduado) e através de microscopia ótica convencional (x10), sendo considerados os parâmetros de motilidade espermática total (0 a 100%) e vigor espermático (escala de 0 a 5), de acordo com as recomendações do Manual de Exame Andrológico do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Adicionalmente alíquotas de 50 µl do sêmen in natura foram fixadas em solução de formol salino a 2% tamponado em PBS para avaliação morfológica em microscopia de contraste de fase (x1000). Os defeitos morfológicos foram classificados em menores e maiores, de acordo com Barth e OKO (1989).

3.6.1 Integridade De Membrana Plasmática

Para essa avaliação foram confeccionados esfregaços em lâmina de vidro de utilizando cada amostra espermática obtida por EE, de acordo com cada grupo experimental. Os esfregaços foram corados com solução Botuvital (Botupharma, Botucatu, Brasil) a base de eosina e nigrosina. De acordo com as características tintoriais dos espermatozoides quando avaliados em microscopia ótica (x1000 em imersão), foram classificadas duas populações espermáticas: espermatozoides com membrana plasmática íntegra (sem marcação tintorial na região da cabeça espermática e/ou acrossomo) ou com membrana plasmática lesionada (corados em rosa claro, de acordo com Figura 8). Para cada amostra foram contabilizadas 200 células espermáticas, sendo considerada para fins estatísticos apenas a subpopulação dotada de membrana plasmática íntegra.

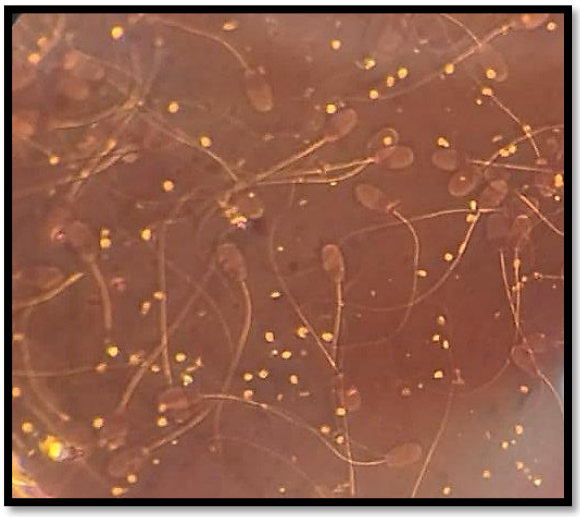


Figura 8: Exemplo de coloração supravital utilizando a associação de eosina e nigrosina para determinação da integridade de membrana plasmática. No exemplo, células sem marcação tintorial na região da cabeça representam espermatozoides íntegros; já os espermatozoides com membrana plasmática lesada encontram-se corados em rosa claro. Fonte: O Autor (2020).

3.7 Análises Estatísticas

Os dados gerados foram analisados através do programa computacional Statistical Analysis System (SAS® Institute Inc., Cary, USA), sendo verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (Proc Univariate) e a homogeneidade das variâncias comparada pelo Teste Qui Quadrado. Os dados foram submetidos à análise de variância (Proc GLM®), considerando o efeito principal do grupo experimental sobre as variáveis comportamentais, multiparamétricas, parâmetros de qualidade espermática e dosagens hormonais. Adicionalmente, foi realizado análise de variância com medidas repetidas no tempo para verificação das possíveis interações dos tratamentos com as diferentes rotinas experimentais e sobre os parâmetros estudados. Para essas análises foi utilizado método de comparação de médias ajustadas através do recurso LSMEANS do SAS®. Análises de correlação foram conduzidas através do software Proc-Cor®, empregando teste de correlação de Pearson. Para todas as análises foi considerado o nível de significância de 5%. Para análise de correlação foram considerados $0,5<r<0,7$ como de média intensidade e $r> 0,7$ como correlação de alta intensidade.

4 RESULTADOS

4.1 Eletroejaculação / Estímulo Elétrico

Foi observado efeito dos diferentes tratamentos anestésicos sobre o número médio de estímulos elétricos necessários para desencadear o processo ejaculatório em caprinos (Tabela 1; P=0,0095).

Tabela 1: Número médio (±SD) de estímulos elétricos necessários para desencadear o processo ejaculatório em caprinos submetidos à eletroejaculação, de acordo com os diferentes grupos experimentais.

Grupos Experimentais	N° médio de estímulos elétricos
G1	18,63 ± 4,32[a]
G2	26,42 ± 10,14[b]
G3	21,35 ± 4,61[ab]
G4	27,76 ± 14,06[b]
G5	21,19 ± 5,73[ab]

*Letras diferentes na mesma coluna indicam as diferenças estatísticas encontradas. Onde: G1: grupo controle; G2: EE com bloqueio realizado a partir da região ventral da inervação pélvica, utilizando como anestésico cloridrato de lidocaína 2%; G3: eletroejaculação com bloqueio ventral da inervação pélvica utilizando a associação de cloridrato de lidocaína 2% e citrato de fentanila; G4: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando lidocaína 2%; G5: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando associação de lidocaína e citrato de fentanila nas mesmas dosagens do G3.

4.2 Pressão Arterial Inicial

A pressão arterial inicial (antes da realização do bloqueio anestésico local e do estímulo elétrico) foi aferida de todos os reprodutores, não sendo observadas diferenças para a pressão sistólica (P=0,1617), pressão média (P=0,3481) e diastólica (P=0,7858) quando comparados os diferentes grupos experimentais.

Tabela 2: Resultados médios (±SD) da pressão (PA1) sistólica, média e diastólica inicial (antes da eletroejaculação) de reprodutores caprinos alocados em diferentes grupos experimentais.

	Pa1 – Sistólica (mm Hg)	Pa1 – Média (mm Hg)	Pa1 – Diastólica (mm Hg)
G1	119,32 ± 26,37 [a]	96,79 ± 31,48[a]	96,26 ± 25,99[a]
G2	132,00 ± 19,48[a]	99,00 ± 27,80[a]	104,00 ± 27,96[a]
G3	120,53 ± 35,00[a]	89,47 ± 40,85[a]	98,41 ± 40,87[a]
G4	141,29 ± 18,05[a]	106,71 ± 31,51[a]	105,76 ± 25,96[a]
G5	126,69 ± 33,32[a]	83,38 ± 32,13[a]	94,69 ± 30,31[a]

*Letras diferentes na mesma coluna indicam as diferenças estatísticas encontradas. Onde: G1: grupo controle; G2: EE com bloqueio realizado a partir da região ventral da inervação pélvica, utilizando como anestésico cloridrato de lidocaína 2%; G3: eletroejaculação com bloqueio ventral da inervação pélvica utilizando a associação de cloridrato de lidocaína 2% e citrato de fentanila; G4: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando lidocaína 2%; G5: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando associação de lidocaína e citrato de fentanila nas mesmas dosagens do G3.

4.3 Pressão Arterial Final

Após a realização dos bloqueios anestésicos locais e condução dos estímulos elétricos relacionados à EE a pressão arterial foi novamente aferida para os animais dos 5 grupos experimentais. Embora não tenham sido observadas diferenças para a pressão sistólica final (P=0,3049), os valores de pressão média (P=0,05) e diastólica (P=0,0095) variaram de acordo com os diferentes grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados médios (±SD) da pressão sistólica, média e diastólica final de reprodutores caprinos alocados em diferentes grupos experimentais.

	Pa2 – Sistólica (mm Hg)	Pa2 – Média (mm Hg)	Pa2 – Diastólica (mm Hg)
G1	155,53 ± 28,17[a]	132,95 ± 29,72[a]	138,74 ± 35,09[a]
G2	157,00 ± 21,43[a]	118,21 ± 22,53[ab]	123,26 ± 25,18[ab]
G3	145,88 ± 29,62[a]	111,12 ± 39,97[ab]	111,53 ± 43,97[b]
G4	142,82 ± 28,32[a]	102,94 ± 32,39[b]	103,06 ± 27,09[b]
G5	141,94 ± 27,30[a]	108,69 ± 26,31[ab]	105,44 ± 29,23[b]

*Letras diferentes na mesma coluna indicam as diferenças estatísticas encontradas. Onde: G1: grupo controle; G2: EE com bloqueio realizado a partir da região ventral da inervação pélvica, utilizando como anestésico cloridrato de lidocaína 2%; G3: eletroejaculação com bloqueio ventral da inervação pélvica utilizando a associação de cloridrato de lidocaína 2% e citrato de fentanila; G4: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando lidocaína 2%; G5: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando associação de lidocaína e citrato de fentanila nas mesmas dosagens do G3.

4.4 Frequência Cardíaca

Não foram observadas diferenças para a frequência cardíaca inicial (P=0,6157) ou final (P=0,9583) quando comparados os diferentes grupos experimentais. No entanto, todos os reprodutores apresentaram aumento da FC após EE (P=0,0410), independente da realização de bloqueio anestésico, demonstrando sensibilidade relacionada à coleta de sêmen por eletroejaculação.

Tabela 4: Média (±SD) da frequência cardíaca avaliada antes (FC INICIAL) ou após (FC FINAL) à eletroejaculação de caprinos, de acordo com os diferentes grupos experimentais.

	Fc Inicial (bpm)	**Fc Final (bpm)**
G1	88,32 ± 15,33[a]	107,79 ± 12,59[a]
G2	82,58 ± 17,29[a]	108,32 ± 20,35[a]
G3	91,71 ± 25,59[a]	105,82 ± 25,19[a]
G4	90,65 ± 17,40[a]	108,00 ± 20,65[a]
G5	89,00 ± 15,59[a]	103,88 ± 16,18[a]

*Letras diferentes na mesma coluna indicam as diferenças estatísticas encontradas. Onde: G1: grupo controle; G2: EE com bloqueio realizado a partir da região ventral da inervação pélvica, utilizando como anestésico cloridrato de lidocaína 2%; G3: eletroejaculação com bloqueio ventral da inervação pélvica utilizando a associação de cloridrato de lidocaína 2% e citrato de fentanila; G4: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando lidocaína 2%; G5: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando associação de lidocaína e citrato de fentanila nas mesmas dosagens do G3.

4.5 Frequência Respiratória

Foram observadas diferenças para a frequência respiratória inicial (P=0,0001) e final (P=0,0002) quando comparados os diferentes grupos; da mesma forma, houve aumento significativo da FR (P<0,0001) para todos os 7 reprodutores avaliados, de forma independente ao tratamento anestésico recebido.

Tabela 5: Média (±SD) da frequência respiratória avaliada antes (FR INICIAL) ou após (FR FINAL) à eletroejaculação de caprinos, de acordo com os diferentes grupos experimentais.

	Fr Inicial (mpm)	Fr Final (mpm)
G1	24,00 ± 3,60[b]	32,37 ± 12,59[a]
G2	30,00 ± 11,08[a]	48,58 ± 20,35[b]
G3	25,00 ± 3,18[b]	31,53 ± 25,19[a]
G4	28,00 ± 5,31[b]	39,59 ± 20,65[a]
G5	25,00 ± 3,87[b]	35,13 ± 16,18[a]

*Letras diferentes na mesma coluna indicam as diferenças estatísticas encontradas. Onde: G1: grupo controle; G2: EE com bloqueio realizado a partir da região ventral da inervação pélvica, utilizando como anestésico cloridrato de lidocaína 2%; G3: eletroejaculação com bloqueio ventral da inervação pélvica utilizando a associação de cloridrato de lidocaína 2% e citrato de fentanila; G4: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando lidocaína 2%; G5: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando associação de lidocaína e citrato de fentanila nas mesmas dosagens do G3.

4.6 Vocalização, Decúbito e Ataxia

Não foram encontradas diferenças para a manifestação de vocalização (P=0,4326), ocorrência de decúbito (P=0,5176) e ataxia (P=0,1078) quando comparados os diferentes grupos experimentais (Tabela 6).

Tabela 6: Média (±SD) da vocalização, ataxia e decúbito em relação aos diferentes bloqueios anestésicos de cada grupo experimental.

	Vocalização	Decúbito	Ataxia
G1	1,79 ± 0,98[a]	0,42 ± 0,5[a]	0,58 ± 0,51[a]
G2	1,63 ± 1,01[a]	0,21 ±0,4[a]	0,37 ± 0,50[a]
G3	1,88 ±0,99[a]	0,24 ±0,4[a]	0,59 ± 0,51[a]
G4	2,12 ± 1,11[a]	0,24 ±0,4[a]	0,41 ± 0,51[a]
G5	1,44 ± 1,26[a]	0,19 ± 0,4[a]	0,19 ± 0,40[a]

*Letras diferentes na mesma coluna indicam as diferenças estatísticas encontradas. Onde: G1: grupo controle; G2: EE com bloqueio realizado a partir da região ventral da inervação pélvica, utilizando como anestésico cloridrato de lidocaína 2%; G3: eletroejaculação com bloqueio ventral da inervação pélvica utilizando a associação de cloridrato de lidocaína 2% e citrato de fentanila; G4: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando lidocaína 2%; G5: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando associação de lidocaína e citrato de fentanila nas mesmas dosagens do G3.

4.7 Motilidade Espermática, Vigor e Volume Seminal

Não foram observadas diferenças para nenhum dos parâmetros de qualidade espermática pesquisados, independente do grupo do experimental (Tabela 7).

Tabela 7: Valores médios (±SD) para a motilidade espermática total (MT, %), vigor (0 a 5) e volume seminal (ml), de acordo com os diferentes grupos experimentais. MT, P=0,6446; vigor, P=0,7187; volume seminal, P=0,0969.

	Mt (%)	Vigor	Volume (mL)
G1	71,11 ± 17,62[a]	3,11 ± 0,78[a]	1,38 ± 0,66[a]
G2	71,11 ± 73,46[a]	2,94 ± 0,70[a]	1,69 ± 0,66[a]
G3	71,65 ± 16,60[a]	3,00 ± 0,59[a]	1,56 ± 0,89[a]
G4	64,41 ± 17,58[a]	2,79 ± 0,69[a]	1,08 ± 0,46[a]
G5	70,00 ± 11,83[a]	2,91 ± 0,58[a]	1,11 ± 1,15[a]

*Letras diferentes na mesma coluna indicam as diferenças estatísticas encontradas Onde: G1: grupo controle; G2: EE com bloqueio realizado a partir da região ventral da inervação pélvica, utilizando como anestésico cloridrato de lidocaína 2%; G3: eletroejaculação com bloqueio ventral da inervação pélvica utilizando a associação de cloridrato de lidocaína 2% e citrato de fentanila; G4: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando lidocaína 2%; G5: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando associação de lidocaína e citrato de fentanila nas mesmas dosagens do G3.

4.8 Cortisol

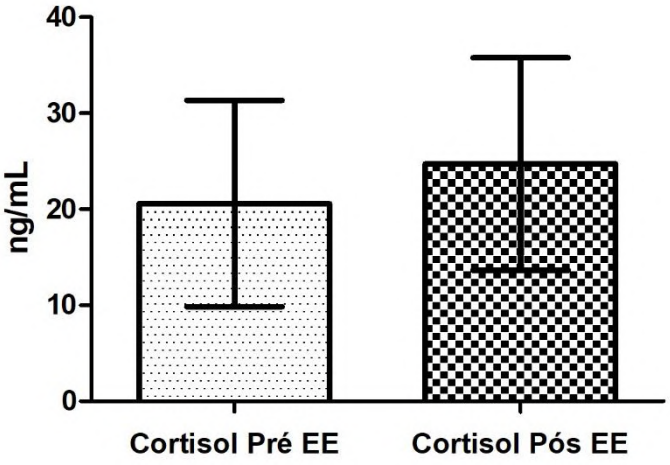
Não foram observadas diferenças para as concentrações iniciais (CI, P=0,5901), finais (CF, P=0,1185) ou para a diferença nos níveis de cortisol antes e após a eletroejaculação (CF-CI, P= 0,2480) quando comparados os diferentes grupos. No entanto, as concentrações séricas de cortisol se elevaram após a realização da eletroejaculação, de forma independente aos grupos experimentais (Gráfico 1; P=0,0438).

Tabela 8: Concentração média (±SD) de cortisol antes (CI) ou após (CF) a eletroejaculação, bem como a diferença (CF-CI) dos níveis desse hormônio entre as duas mensurações realizadas.

	Cortisol Inicial (ng/mL)	Final (ng/mL)	Diferença (ng/mL)
G1	20,82 ± 8,07[a]	25,50 ± 5,48[a]	4,68 ± 7,34[a]
G2	19,35 ± 10,28[a]	26,81 ± 13,05[a]	7,46 ± 13,73[a]
G3	20,15 ± 11,06[a]	17,22 ± 23,09[a]	-2,93 ± 17,17[a]
G4	22,23 ± 12,74[a]	29,52 ± 13,50[a]	7,94 ± 19,32[a]
G5	20,49 ± 13,91[a]	23,90 ± 8,11[a]	3,42 ± 8,72[a]

*Letras diferentes na mesma coluna indicam as diferenças estatísticas encontradas. Onde: G1: grupo controle; G2: EE com bloqueio realizado a partir da região ventral da inervação pélvica, utilizando como anestésico cloridrato de lidocaína 2%; G3: eletroejaculação com bloqueio ventral da inervação pélvica utilizando a associação de cloridrato de lidocaína 2% e citrato de fentanila; G4: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando lidocaína 2%; G5: EE com bloqueio da inervação pélvica através do acesso perineal, utilizando associação de lidocaína e citrato de fentanila nas mesmas dosagens do G3

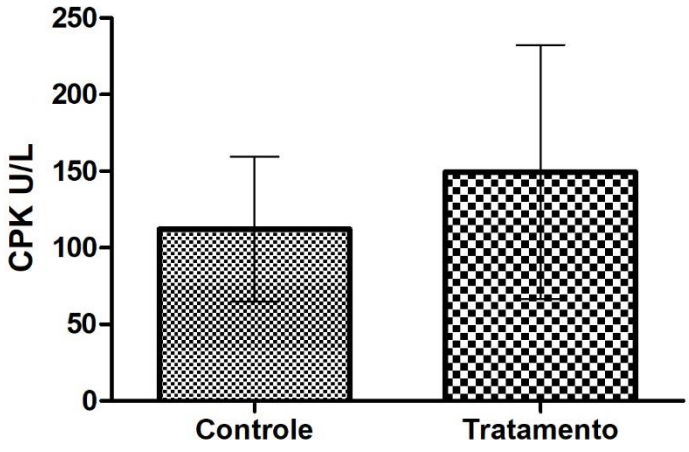
Gráfico 1: Níveis séricos de cortisol mensurados antes (Cortisol Pré) ou após (Pós EEJ) a eletroejaculação de caprinos, de forma independente aos diferentes grupos experimentais.



4.9 Creatina Fosfoquinase (CPK)

Foi observada tendência de elevação das concentrações de creatinina fosfoquinase (P=0,0591) quando comparados os momentos pré (132,47 ± 99,37 U/L) e pós eletroejaculação (146,49 ± 103,65 U/L), de forma independente aos tratamentos anestésicos. Os níveis de CPK foram semelhantes entre os diferentes tratamentos no momento pré eletroejaculação (P=0,2443). No entanto, houve tendência de aumento de CPK para os grupos experimentais que receberam os bloqueios anestésicos no momento pós eletroejaculação (G1 = 112,10a ± 47,35 U/L; G2 = 118,60a ± 40,62 U/L; G3 = 124,55a ± 66,57 U/L; G4 = 175,50b ± 102,00 U/L; G5= 158,30a ± 69,63 U/L; P=0,0785). Considerando o efeito isolado dos tratamentos (independente do grupo experimental; (Gráfico 2) foi observado que animais que receberam bloqueio anestésico apresentaram maior concentração de CPK pós-eletroejaculação (149,40 ± 83,08 U/L) quando comparados ao grupo controle não tratado (112,10 ± 47,35 U/L; P=0,05).

Gráfico 2: Níveis séricos de creatinina fosfoquinase (CPK) mensurada após a eletroejaculação de caprinos, de forma independente aos diferentes grupos experimentais. Onde: Controle: eletroejaculação convencional; Tratamento: eletroejaculação após bloqueio anestésico local.



5 DISCUSSÃO

A utilização da eletroejaculação pode ser de grande valia para o desenvolvimento reprodutivo na caprinocultura, vislumbrando agilidade no processo ejaculatório e consequentemente maior número de amostra de sêmen, facilitando o melhoramento genético e assim melhorando a capacidade produtiva do animal (SILVEIRA et al.,2011).

O equipamento de EE é um aparelho compacto, leve e fácil de manusear, podendo ser utilizado a campo e tem como objetivo levar o animal ao processo ejaculatório através de pulsos elétricos de baixa tensão por via retal. Atualmente na pecuária a importância do bem-estar animal vem ganhando força e por esse motivo o emprego da eletroejaculação vem sendo banido em alguns países, por representar uma técnica que aumenta o estresse e ocasiona desconforto doloroso, pois ao utiliza-la podemos observar um aumento dos parâmetros fisiológico, como, FR, FC, PA e níveis séricos de cortisol (SEVERO, 2017).

No propósito da utilização do EE, foram realizados estudos preconizando a diminuição do estresse e o desconforto doloroso, onde foi utilizado protocolos anestésicos gerais, sedativos e bloqueios. No presente estudo foi observado nos grupos G2, G3, G4 e G5, um aumento de tempo do processo ejaculatório após utilização dos bloqueios anestésicos, em comparação ao G1, grupo de caprinos que não foi utilizado nenhum tipo de bloqueio antes da EE. O aumento no tempo irá influenciar na quantidade de estímulos elétricos, e por consequência a relação do desconforto doloroso e estresse também aumentará, sendo ainda maior no G2 e G4. Segundo Sánchez et al., (2019) o não houve diferença no tempo do processo ejaculatório em relação os animais tratados com anestesia geral ou sedação. No experimento de Pagliosa (2015), foi realizado bloqueio anestésico epidural utilizando dois protocolos anestésicos, e como divergência ao presente estudo não foram identificadas diferenças no tempo ejaculatório em relação aos animais controles. Portando os estímulos elétricos não aumentaram em relação aos protocolos anestésicos e a via epidural, melhorando o desconforto doloroso e o estresse.

Em relação a pressão arterial inicial (PAS) que antecedeu o bloqueio anestésico e a EE, não foram observadas diferenças entre pressão arterial final (PAS),

mas houve aumento da amplitude para todos os grupos tratados, principalmente no grupo G2, demostrando maior desconforto e estresse em relação aos outros, está maior variação está relacionado ao protocolo anestésico, pois a lidocaína sem associação de fentanila tem um potencial analgésico menor e por consequência aumentara o desconforto doloroso e estresse .O aumento da pressão arterial, está relacionado a fatores dolorosos, como demostrado no trabalho de Saccó et. al., (2013), onde foi observado, em humanos, que a dor nocciptiva ascendente, é o recrutamento de reflexos espinhais por meio das conexões neuronais, e sua magnitude esta relaciona a duração do estímulo doloroso. Esses reflexos espinhais causam a ativação do sistema nervoso simpático, aumentando as resistências periféricas, frequência cardíaca e o volume sistólico e, por fim, a PA. No trabalho de Pagliosa (2015) foram testados vários protocolos anestésicos via bloqueio epidural em touros. Os efeitos encontrados em relação a PA foram contraditórios ao presente estudo, pois não houve aumento considerável entre o momento inicial e final (PA), ou seja, o bloqueio anestésico epidural teve melhor efeito analgésico em comparação aos bloqueios anestésico utilizado nesse experimento.

Em relação aos resultados de frequência cardíaca (FC) e respiratória (FR) não houve diferenças estatísticas, porém são visíveis os aumentos de amplitude no monte final, ou seja, após o bloqueio anestésico e EE, observado ainda mais esse efeito no grupo G2, demonstrando sensibilidade relacionada à coleta de sêmen por eletroejaculação. Foi também observado esse aumento de amplitude de (FR) e (FC) segundo os autores Damián e Ungerfeld (2011) e Orihuela et al. (2009), onde os autores definiram esses resultados como reflexo de dor e estresse. Em comparação aos artigos citados e o presente estudo, podemos constatar o aumento do estresse e o efeito doloroso devido os resultados obtidos da FC e FR.

Alguns métodos utilizados para diminuir o desconforto doloroso da EE podem possibilitar a ataxia e o decúbito, essa evidência está de acordo com Sánchez et al. (2018), onde os animais tratados com anestesia geral demoraram mais para se levantarem, demostrando ataxia. No presente estudo não foram observadas diferenças de decúbito ou ataxia em relação aos grupos controle e tratados, portando os bloqueios anestésicos não induziram esses efeitos adversos.

As vocalizações podem ser usadas como indicadores de dor, portanto, estão associadas a liberação de pulsos elétricos durante a EE em carneiros (DAMIÁN; UNGERFELD, 2011). No presente estudo não foi demostrada nenhuma diferença estatística entre os grupos experimentais em relação a vocalização, mas foi observado um maior aumento na vocalização em relação grupo G4, pois foi o que mais obteve estímulo elétrico para o processo ejaculatório e por consequência desconforto doloroso. Já em contraste, no experimento de Sanchez et al. (2018) foi demonstrado que o protocolo de sedação foi melhor do que o de anestesia geral em relação a vocalização. Esta diminuição da vocalização também foi notável no trabalho do autor Pagliosa et al. (2015), onde foi realizado o bloqueio epidural em bovinos Nelore.

A forma de coleta de sêmen pode interferir diretamente na sua qualidade, conforme demonstrado pelo autor Chen et al. (2020). A utilização do EE de baixa tensão, usando de 2 - 3 volts com uma corrente máxima de 500mA, favorece a qualidade do sêmen em comparação aos equipamentos que possuem uma corrente máxima de 900mA. Este dado está relacionado com a diminuição do desconforto e estresse. No presente estudo foi utilizado um equipamento de baixa voltagem, com tensão de 3 volts no modo automático, que também proporciona uma melhora no desconforto doloroso em comparação ao modo manual, conforme observado no experimento de Neves (2018), que realizou essa comparação em bovinos, onde foi demostrado menor desconforto doloroso e estresse quando o equipamento era utilizado no modo automático. No presente experimento não houve diferenças nas análises seminais em motilidade, vigor e volume seminal em relação ao grupo G1, ou seja, os efeitos dos fármacos não influenciaram na produção de sêmen ou na sua ejeção. Foi observado algumas diferenças no trabalho de Sanchez et al. (2018), onde a sedação teve melhor qualidade do sêmen em relação a anestesia geral, esta relação está de acordo com as observações anteriores em gatos, onde foi relatado que a cetamina afeta negativamente a qualidade do sêmen (Zambelli et al., 2007).

O cortisol é um hormônio que está relacionado com o aumento do estresse e da dor, sendo notável o seu aumento sérico em alguns trabalhos relacionados a EE, seja com tratamento anestésico geral, sedativo ou bloqueios (WHITLOCK et al., 2012). O aumento da concentração sérica do cortisol foi observado em todos os grupos sem diferenças estatísticas, porém é notável uma elevação do cortisol sérico

após a realização da eletroejaculação, de forma independente aos grupos experimentais. Segundo Sanchez et.,al. (2018) o efeito do cortisol sérico em comparação ao animal sedado, induzido a anestesia geral e não tratados demonstrou uma igualdade nos níveis séricos de cortisol para todos os animais, ou seja, grupo controle e os tratados. O aumento na concentração de cortisol foi semelhante para todos os procedimentos, conforme previamente observado por Falk et al. (2001), que não observou diferenças na concentração de cortisol no sangue após EE entre os bloqueios anestesiados via epidural e não anestesiados.

O aumento na concentração sérica de CPK após a EE demonstra que a atividade da enzima foi maior nos grupos que receberam bloqueio anestésico, em comparação com o grupo controle (G1). Isso possivelmente se deve ao fato de que a dessensibilização da inervação envolvida no processo ejaculatório elevou o número de estímulos elétricos necessários para promover a ejaculação nos grupos tratados (Gráfico 2). A elevação da quantidade de estímulos induz, consequentemente, contrações musculares involuntárias por mais tempo, elevando a CPK de maneira mais expressiva. Tais observações corroboram resultados anteriores (DAMIÁN; UNGERFELD, 2011; FUMAGALLI; et al., 2011; UNGERFELD et. al, 2015; UNGERFELD et al., 2018) que demonstraram elevação da enzima após a EE. Segundo Lopes et al. (2005), a concentração sérica da CK encontra-se elevada poucos minutos após a lesão e atinge o pico em 12 horas. Deste modo, é possível concluir que ao induzir a contração muscular, a EE provoca possíveis microlesões musculares e, por esse motivo, a elevação de CPK foi diretamente proporcional ao número de estímulos elétricos empregados para conduzir a ejaculação nos diferentes grupos.

Os resultados obtidos nesse estudo foram uteis para demostrar que os uso de bloqueios anestésicos em região pélvica, seja por acesso ventral ou perineal, podem causar um aumento do estimulo elétrico e intensidade de pulsos para o processo ejaculatório, pois os anestésicos dessensibilizam as terminações nervosas que estão relacionadas ao processo ejaculatório, desta forma haverá maior desconforto doloroso e estresse.

6 CONCLUSÃO

É possível concluir que a utilização dos bloqueios anestésicos, seja por acesso ventral ou perineal, aumentou o tempo médio para ocorrência do processo ejaculatório, resultando em aumento dos níveis séricos da enzima creatinina fosfoquinase (CPK), fatores que podem ser associados com maior desconforto doloroso e estresse relacionados à EE. Esse efeito doloroso foi ainda foi maior nos grupos que utilizaram lidocaína sem a associação do opioide fentanila. O bloqueio pélvico por acesso ventral demostrou maior desconforto em relação ao perineal, sendo ainda mais visível quando só utilizado a lidocaína.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABRIL-SÁNCHEZ, S et al. Sedation or anaesthesia decrease the stress response to electroejaculation and improve the quality of the collected semen in goat bucks. **Animal**, Montevideo, v. 12, n. 12, p. 2598-2608, 2018.

ABRIL-SÁNCHEZ, S et al. Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: a review on welfare problems and alternative techniques. **Animal Reproduction Science**, v. 205, p. 1-9, 2019.

AKTAS, M et al. Creatine kinase in the dog: A review. **Veterinary Research Communications,** v. 17, n. 5, p. 353–369. 1993.

ALOMAR, M et al. Testosterone and cortisol patterns and the effects of electro-ejaculation and copulation in Awassirams. **Arch. Anim. Breed**, v. 59, p. 139–144, 2016.

ARAUJO, D R et al*.* Anestésicos locais: Interação com membranas biológicas e com o canal de sódio voltagem-dependente. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1775-1783, 2008.

BATISTA, N L; SOUSA B B. Caprinovinocultura no semiárido brasileiro - fatores limitantes e ações de mitigação. **Revista ACSA**, Campos dos Patos, v. 11, n. 2, p. 01-09, 2015.

BARBOSA, V F et al. Lidocaína intravenosa como alternativa analgésica em ovino: estudo de caso. **Enciclopédia Biosfera,** v. 11, p. 2141-2150, 2015

BERNINGER, M T et al. Effect of local infiltration analgesia, peripheral nerve blocks, general and spinal anesthesia on early functional recovery and pain control in unicompartmental knee arthroplasty. **Bmc Musculoskeletal Disorders**, v. 19, n. 1, p. 1-10, 2018.

BECKER, D E; REED K L. Essentials of Local Anesthetic Pharmacology. **Continuing Education**, California, v. 53, n. 3, p. 98-109, 2006.

BILLE, C et al. Risk of anaesthetic mortality in dogs and cats: an observational cohort study of 3546 cases. **Vet. Anaesth. Analg**. v. 39, n. 1, p. 59-68, 2012.

BOND, G B et al. Métodos de diagnóstico e pontos críticos de bem estar de bovinos leiteiros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, p.1286-1293, 2012.

MAIA, M S; NOGUEIRA D M. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manejo Reprodutivo de Caprinos e Ovinos em Regiões Tropicais.** Petrolina; Embrapa, 2019

BRODBELT, D C et al; The risk of death: the confidential enquiry into perioperative small animal fatalities. **Vet. Anaesth. Analg,** v. 35, n.5, p. 365–373, 2008.

BRENNER, I K et al. Impact of three different types of exercise on components of the inflammatory response. **European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology**, v. 80, n. 5, p. 452-460, 1999.

BROOM, D. M. Animal welfare: concepts and measurement. **Journal Auh Sci**. United Kingdom, v. 69, n. 10, p. 4167-4175, 1991.

BURKE, M J. et al. Evaluation of the analgesic and pharmacokinetic properties of transdermally administered fentanyl in goats. **Journal Of Veterinary Emergency And Critical Care**. Kennett Square, v. 27, n. 5, p. 539-547, 2017.

CABALA, R W. **Uso da anestesia locorregional periférica em caninos e bovinos. Um estudo clínico e experimental. 85 f.** Dissertação (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2016.

CAMELA, E S C. **Ultrassonografia de glândulas genitais acessórias em carneiros da raça dorper – caracterização e correlações reprodutivas.** Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista – Unesp Câmpus de Jaboticabal, Jaboticabal, 2015.

CARVALHAL, M V L; COSTA, F. Principais aspectos sobre bem-estar de touros mantidos em centrais de coleta de sêmen. **Revista Brasileira de Zoociências**, v. 19, n. 2, p. 249-264, 2018.

CHEN, Y H et al. Novel Low-Voltage Electro-Ejaculation Approach for Sperm Collection from Zoo Captive Lanyu Miniature Pigs (Sus barbatus sumatranus). **Animals**, Taiwan, v. 10, n. 10, p. 1-13, 2020.

COOK, C J**.** Basal and stress response cortisol levels and stress avoidance learning in sheep (Ovis aries). **The New Zealand Veterinary Journal**, v. 44, n. 4, p. 162-163, 1996.

COSTA E SILVA, E V et al. Estratégias para avaliar bem-estar animal em animais em reprodução. **Ciênc. vet. tróp**., Recife, v. 13, p. 20-28. 2010

CUNHA, F G A. **Anestesia, pequenos ruminantes, dor.** 48 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

CUNNINGHAM, J G. **Tratado de Fisiologia Veterinária.** 5. ed. Elsevie, 2014.

DAMIÁN, J P; UNGERFELD, R. The stress response of frequently electroejaculated rams to electroejaculation: hormonal, physiological, biochemical haematological and behavioural parameters. Reproduction in Domestic Animals, v. 46, p. 646 –65. 2011.

DIAZ, G J. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 3. ed. Rio Grande do Sul. 2017.

DRUMOND, J P. Fisiologia da Nocicepção. In: Drumond JP e Marquez JO**.** Dor neuropática: Fisiopatologia, Clínica e Terapêutica. Ed 1, Curitiba: Evidence. 2005.

EAPPEN, S; DATTA S. Pharmacology of Local Anesthetics. **Seminars in Anesthesia. Perioperative Medicine and Pain**, v. 17, n. 1, p. 10-17. 1998.

EBBELING, C B; CLARKSON, P M. Exercise-Induced Muscle Damage and Adaptation. **Sports Medicine**, v. 7, n. 4, p. 207-234,1989.

EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. **Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. Produção Mundial**. Disponível em: https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/producao-mundial. 2018

ETSON, C J; WALDNER, C L; BARTH, A D. Evaluation of segmented rectal probe and caudal epidural anaesthesia for electroejaculation of bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 45, n. 3, p. 235-240, 2004.

FALK, A J et al. Effects of epidural lidocaine anesthesia on bulls during electroejaculation. **Canadian Veterinary Journal**, v. 42, p. 116–120. 2001

FUMAGALLI, F et al. Physiological and Biochemical Parameters in Response to Electroejaculation in Adult and Yearling Anesthetized Pampas Deer (Ozotoceros bezoarticus) Males. **Reproduction In Domestic Animals**, v. 47, n. 2, p. 308-312, 2011.

GIULIANO, F. Neurophysiology of Erection and Ejaculation. **The Journal Of Sexual Medicine**, v. 8, n. 4, p. 310-315, 2011.

GONZAGA, M C. **Técnicas de anestesia local dos membros locomotores de bovinos**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 43 f. 2016.

GONZALEZ, R A et al. Hair cortisol levels, psychological stress and psychopathological symptoms as predictors of postpartum depression. **Plos One**, Frankfurt, v. 12, n. 8, p. 1-17, 2017.

GOTTSCHALK A, SMITH D S. **New concepts in acute pain therapy: preemptive analgesia**. Am Fam Physician, p. 1979-84. 2001

GRANADOS, L B C et al. **Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos**. Campos dos Goytacazes: Projeto Proex/uenf, 54 p. 2006.

HAFEZ, E S E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7°ed. São Paulo: Manole. . 2004.

HELLYER, P W; ROBERTSON, S A; FAILS, A D. **Pain and its management**. IN: Tranquili WJ, Thurmon JC, Grimm KA. Lumb and Jones' Veterinary Anesthesia and analgesia. ed iowa. 2007.

HERNANDEZ, C et al. Time lag between peak concentrations of plasma and salivary cortisol following a stressful procedure in dairy cattle**.** Acta Veterinaria Scandinavica, v. 56, n. 1, p. 1-8. 2014.

JONGEN, J L M. Propagation of Spinal Nociceptive Activity in the Spatial and Temporal Domains. **The Neuroscientist**, Netherlands, v. 18, n. 1, p. 8-14, 2012.

KNOTT, S A et al. Feed efficiency and body composition are related to cortisol response to adrenocorticotropin hormone and insulin-induced hypoglycemia in rams. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 39, n. 2, p. 137-146. 2010.

KÖNIG, Horst Erich; LIEBICH, Hans-Georg. **Anatomia dos Animais Domésticos-: Texto e Atlas Colorido**. 6ª Edição. Porto Alegre: Editora Artmed, 2016.

LOPES, S T A et al. Determinação da Creatina Quinase em Cães. **Revista da FZVA,** Uruguaiana, v. 12, n. 1, p. 116-122, 2005.

MARIZ, M A S. A anatomia do nervo pudendo e seu bloqueio anestésico em caprinos. **Ciência Animal**, Paraíba, v. 1, n. 11, p. 22-33, 2001.

MARTINEZ, A C et al. Colheita de sêmen por eletroejaculação em cutia-parda (Dasyprocta azarae). **Pesq. Vet. Bras**., Rio de Janeiro, v. 33, n. 1, p. 86-88, 2013.

MATTOSINHO, R O. Alterações hematológicas e bioquímica sérica de equinos atletas. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 4, n. 1, p. 82-91, 2017.

MATTERI, R L; CARROLL, J A; DYER, C J. Neuroendocrine Responses to Stress. In: Moberg, G. P., Mench, J. A. **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare.** Edição Ilustraded. California: Editora Calbi, 2000.

MILLER, W L. The Hypothalamic Pituitary Adrenal Axis: a brief history. Hormone **Research In Paediatrics**, v. 89, n. 4, p. 212-223, 2018.

MONK, J E; BELSON, S; LEE, C. Pharmacologically-induced stress has minimal impact on judgement and attention biases in sheep. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

MOSURE, W L et al. Evaluation of possible methods to reduce pain associated with electroejaculation in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 39, n. 8, p. 504–506, 1998.

MUJIKA, I et al. Physiological changes associated with the pre-event taper in athletes. **Sports Medicine**, v. 34, n. 13, p. 891-927, 2004.

NEVES, T C. **Parâmetros biométricos, fisiológicos e reprodutivos em touros das raças nelore e tabapuã, e avaliação do estresse na coleta de sêmen por eletroejaculação manual e automática.** 2018. 44 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

OBA, E et al. Níveis Plasmáticos De Colesterol Total, Lipoproteínas De Alta Densidade (Hdl) E Cortisol, E Sua Biorritmicidade, Em Carneiros Ideal-Polwarth. **Ciência Animal Brasileira**, Botucatu, v. 7, n. 4, p. 433-438, 2006.

ORLANDO, C F P. **Mecanismos da dor neuropática.** Dissertação (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Goiás Escola de Veterinária e Zootecnia, Goiás, 2011.

ORIHUELA, A et al. Breaking down the effect of electro-ejaculation on the serum cortisol response, heart and respiratory rates in hair sheep (Ovis aries). **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v. 8, n. 10, p. 1968–1972. 2009.

PALMER, C W et al. Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. **Animal Rreproduction Science**, v.87, n. 1-2, p. 25-31, 2005.

PAGLIOSA, R C. Efficacy of caudal epidural injection of lidocaine, xylazine and xylazine plus hyaluronidase in reducing discomfort produced by electroejaculation in bulls. **J. Vet. Med. Sci**, Campo Grande, v. 77, n.11, p. 1339-1345, 2015.

PALMER, C W et al. Use of oxytocin and cloprost enol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 80, n. 3-4, p. 213-223, 2004.

PATEL, N B; KOPF, A. Guide to pain management in low-resource settings. Amsterdan: Internacional Association for the Study of Pain. cap. 3, p.13-18, 2010.

PETERS, M D P., BARBOSA SILVEIRA, I D, PEREIRA, L M R. Manejo aversivo em bovinos leiteiros e efeitos no bem-estar, comportamento e aspectos produtivos. **Archivos de Zootecnia**, v.59, n. 227, p.435-442, 2010.

RIEK, A. Comparison of cortisol concentrations in plasma and saliva in dairy cattle following ACTH stimulation. **Journal Of Dairy Research**. Celle, v. 86, n. 4, p. 406-409, 2019.

RUEDA, P M; PARANHOS DA COSTA, M J R. Efeito do treinamento na expressão do temperamento de bovinos e implicações no desempenho produtivo. In: ENCONTRO ANUAL DE ETOLOGIA, Alfenas. Anais: Sociedade Brasileira de Etologia, p.220-224, 2010.

RICARTE, A R F; SILVA A R. Morfofisiologia da reprodução de caprinos: revisão. **Acta Veterinaria Brasilica,** Mossoró, Rio Grande do Norte, v. 4, p. 8-13, 2010.

SALISBURY et al. Physiology ofreproduction and artificial insemination of cattle. 2nd. ed. San Francisco: W.H. Freeman, 1978

SANCHEZ, S et al. Ejaculation does not contribute to the stress response to electroejaculation in sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n.3, p. 403–408, 2017.

SANCHEZ, S. et al. Sedation or anaesthesia decrease the stress response to electroejaculation and improve the quality of the collected semen in goat bucks. **Animal**, v. 12, n. 12, p. 2598-2608, 2018.

SANCHEZ, S. et al. Sperm collection by electroejaculation in small ruminants: A review on welfare problems and alternative techniques. **Animal Reproduction Science**, v.205, p. 1-9, 2019.

SANTANA, C J. **Manual de Caprinocultura**. Recife: Sebrae, 35 p. 2000.

SANTOS, R B et al. Aspectos moleculares da espermatogênese. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 13, p. 1-91, 2016.

SEVERO, N C. **História ilustrada da inseminação artificial. São Paulo: Livre Expressão**, v. 408. 2013.

SEVERO, N C. Eletro-ejaculação e massagem dos genitais internos: impacto sobre o bem-estar animal. In 2ª Reunião Da Associação Brasileira De Andrologia Animal (ABRAA), Corumbá. **Anais**. Corumbá, 2017, 6 p.

SILVA, A L O C et al. **Manual de Criação de Caprinos e Ovinos**. Brasília: Codevasf, p 141, 2011.

SILVA, M G C M; VALLE, T A. Produção de caprinos**.** Lavras: Editora Ufla, 108 p. 2018.

SILVA, C R A; SILVA, F L; FEITOSA JÚNIOR, F S**.** Técnica peridural com uso de lidocaína e bupivacaína associados ao fentanil, em cadelas submetidas à ovariosalpingohisterectomia. **Pubvet**, v. 12, n. 9, p. 1-6, Editora MV Valero. 2018.

SILVEIRA, R O, et al. Ciclo Estral em cabras. Anais III Simpac, Viçosa, v. 3, n. 1, p. 158-163, 2011.

SMITH, E. Advances in understanding nociception and neuropathic pain. **Journal Of Neurology**. v. 265, n. 2, p. 231-238, 2018.

SACCÒ, M et al. The Relationship Between Blood Pressure and Pain. **The Journal Of Clinical Hypertension**, v. 15, n. 8, p. 600-605, 2013.

STEEDS, C E. The anatomy and physiology of pain. Surgery (Oxford), v. 27, n. 12, p. 507-511, 2016.

TOTSUKA, M et al. Break point of serum creatine kinase release after endurance exercise. **Journal of Applied Physiology,** v. 93, n. 4, p. 1280-1286, 2002.

UNGERFELD, R at al. Administration of cloprostenol and oxytocin before electroejaculation in goat bucks reduces the needed amount of electrical stimulation without affecting seminal quality. **Theriogenology**, v. 107, p. 1–5, 2018.

UNGERFELD, R et al. Physiological responses and characteristics of sperm collected after electroejaculation or transrectal ultrasound-guided massage of the accessory sex

glands in anesthetized mouflons (Ovis musimon) and Iberian ibexes (Capra pyrenaica). **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1067-1074, 2015.

WHITLOCK, B K et al. Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. **Theriogenology**, v. 78, n. 4, p. 737-746, 2012.

ZAMBELLI D et al. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. **Theriogenology**. v. 68, n. 5, p. 796–803, 2007.