

Efeitos do índice de temperatura e umidade sobre a morfologia espermática de coelhos

Fellype Rodrigo Barroso Costa¹; Hiara Marques Meneses²; Monalisa Eva Santos Evangelista³; Dayanne Lima de Sousa⁴; Karoliny Farias Castelo Branco⁵; Raisa Rodrigues Rios⁶; Fabiano Malveira Barboza⁷; Carla Renata Figueiredo Gadelha⁸; Ana Cláudia Nascimento Campos⁹

RESUMO: Os coelhos domésticos são animais bastante afetados por mudanças ambientais. As principais alterações percebidas em coelhos criados no Nordeste brasileiro são ligadas à parte reprodutiva dos mesmos. Existe a necessidade de serem realizados estudos mais aprofundados acerca da ocorrência de alterações morfológicas em espermatozoides de coelhos causadas por estresse térmico, um dos principais problemas na criação desse animal na nossa região. Objetivou-se com este trabalho avaliar os efeitos do ITU em clima tropical sobre a morfologia espermática em coelhos, além de verificar a correlação existente entre os parâmetros seminais. Para tanto, foram feitas coletas de sêmen em 20 coelhos da raça Nova Zelândia Branco selecionados aleatoriamente. Após as coletas foram feitos esfregaços das amostras de cada animal, para futura visualização das alterações morfológicas causadas pelos diferentes ITU's. Os esfregaços foram corados com solução azul de bromofenol. A partir de então foram avaliadas 200 células em cada lâmina, por meio de microscopia óptica de imersão

(1000x). Após essa leitura, os defeitos foram classificados em defeitos maiores e menores, expressos em números reais. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, dados obtidos foram submetidos à análise de variância, as médias para os efeitos significativos foram comparados pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade de erro. Procedeu-se ainda o estudo das correlações de Pearson, para verificar o grau de associação entre a morfologia espermática de coelhos e o ITU. Para a análise dos dados utilizou-se o programa estatístico SAS versão 9.1 (2003). No mês de maio, os valores de ITU e temperatura retal apresentaram-se muito altos, o que causou estresse térmico muito severo, resultando em anormalidades morfológicas nos espermatozoides dos coelhos. No mês de outubro, o estresse térmico foi ausente, porém verificou-se um grande número de anormalidades espermáticas, fato esse que não pôde ser explicado no presente trabalho. Conclui-se que o estresse térmico afetou negativamente a morfologia espermática de coelhos aumentando a incidências de anormalidades nas células espermáticas.

Palavras-chave: coelhos; defeitos maiores; defeitos menores; morfologia espermática

Effect of temperature and humidity index on rabbits' spermatozoa morphology

ABSTRACT: Domestic rabbits are animals greatly affected by environmental changes. The main changes perceived in rabbits bred in northeastern Brazil are linked to reproductive part thereof. There needs to be carried out further studies on the morphological changes in spermatozoa of rabbits caused by thermal stress, one of the main problems of creating this animal in our region. The objective of this study was to evaluate the effects of UTI in tropical climate on the morphology of spermatozoa of rabbits, besides verifying the correlation between seminal parameters. Therefore, semen collections were made in 20 rabbits of New Zealand White randomly selected. After the

collections were smears of samples from each animal for future viewing of the morphological changes caused by different UTIs. The smears were stained with bromophenol blue solution. Thereafter 200 cells were evaluated for each slide by immersion light microscopy (1000X). After reading this, the defects were classified into major and minor defects, expressed in real numbers. The experiment was conducted in a completely randomized design, data were subjected to analysis of variance, the means for significant effects were compared by Duncan test at 5% probability. The procedure was still studying the Pearson correlations to assess the degree of association between sperm morphology of rabbits and ITU. For data analysis we used the SAS statistical software version 9.1 (2003). In May, the values of UTI and rectal temperature showed up too high, which caused very severe heat stress, resulting in morphological abnormalities in spermatozoa of rabbits. In October, the thermal stress was absent, but there was a large number of abnormal sperm, a fact that could not be explained in this paper. We conclude that heat stress negatively affected the morphology of rabbits increasing incidence of abnormalities in sperm cells.

Key words: rabbits; major defects; minor defects; sperm morphology

¹ Mestranda em Irrigação–UFC, Ceará, Brasil. Email: fellyperodrigo@yahoo.com.br.

² Mestranda em Zootecnia–UFC, Ceará, Brasil. Email: hiaramarquestar@hotmail.com

³ Mestranda em Zootecnia – UFC, Ceará, Brasil. Email: monalisaeva@hotmail.com

⁴ Mestranda em Zootecnia –UFC, Ceará, Brasil. Email: dayannels@hotmail.com

⁵ Mestranda em Zootecnia –UFC, Ceará, Brasil. Email: karolinyfarias@gmail.com

⁶ Mestranda em Ciências Veterinárias –UECE, Ceará, Brasil. Email: raisa.rios@hotmail.com

⁷ Zootecnista –Fortaleza Ceará. Email: fabianomalveira@hotmail.com

⁸ Professora do Departamento de Zootecnia ,UFC/ Fortaleza-Ce. Email: crgadelha@yahoo.com.br

⁹ Professora do Departamento de Zootecnia ,UFC/ Fortaleza-Ce. Email: acncampos11@gmail.com

Introdução

Os coelhos domésticos são mamíferos, lagomorfos, da família dos Leporídeos, em geral dos gêneros *Oryctolagus* e *Sylvilagus*. Caracterizam-se por serem bastante prolíferos, sendo que uma fêmea em boas condições nutricionais e sanitárias pode ter de 6 a 7 gestações por ano, podendo nascer de 3 a 12 láparos por gestação. A espécie mais comum é a *Oryctolagus cuniculus*. A raça mais utilizada para fins laboratoriais e de produção é a Nova Zelândia Branco, classificada como raça de tamanho médio e caracterizada por pelagem branca, orelhas longas e olhos vermelhos. São descendentes do coelho europeu, e tem como centro de origem o norte da África e sul da Europa (ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE CRIADORES DE COELHOS, 2005).

A análise morfológica dos espermatozoides de coelhos é essencial para estabelecer os parâmetros fisiológicos do sêmen (IRRG, 2005). Além disso, estudos recentes demonstraram que as características do sêmen, em especial as morfológicas, apresentam de média a alta herdabilidade (LAVARA *et al.*, 2008a) podendo ser realizada pelos procedimentos de microscopia óptica usando diferentes técnicas de coloração (IRRG, 2005).

O espermatozoide de coelhos tem de 46 a 55 μm de comprimento total (CUMMINS e WOODALL, 1985; EDDY, 2006), sendo o comprimento de cabeça de 7,8 μm (GRAVANCE e DAVIS, 1995) a 8,6 μm (BEDFORD, 1963), 8,5 μm de peça intermediária com as mitocôndrias organizadas em cerca de 41 giros, arranjados em uma hélice quádrupla ou quádrupla (EDDY,

2006). A peça principal mede em torno de 38 μm de comprimento (CUMMINS e WOODALL, 1985). A cabeça tem forma de espátula e o acrossoma não se estende além do núcleo, apresenta também uma pequena região equatorial (PHILLIPS, 1977; EDDY, 2006).

KUZMINSKY *et al.* (1996) elaboraram um guia ilustrado com as diferentes anormalidades do sêmen de coelhos. Os valores médios percentuais quantitativos observados pela microscopia óptica (x 400) foram: 18,2% anormalidades total, anormalidades da cabeça 2,9%, anormalidades de cauda 13,6% e 1,7% de espermatozoides quebrados. Os autores sugeriram que para acelerar o processo de análise do sêmen apenas as caudas enroladas sejam contadas, pois estas são as mais representativas das anormalidades de cauda e são facilmente observadas ao microscópio óptico, mesmo quando observados em pequeno aumento. Também afirmaram

que, para que um ejaculado seja considerado aceitável, a concentração de espermatozoides com caudas enroladas não deverá exceder 17-18% das 200 células observadas. Ressalta-se ainda que os espermatozoides de coelhos são muito sensíveis a altas temperaturas ambientais, e anormalidades espermáticas podem indicar uma condição de sofrimento do animal pelo estresse térmico (FINZI *et al.*, 1995). Os autores afirmaram ainda que essa condição pode ser facilmente observada pelo aumento no número de espermatozoide com cauda enrolada, visto que esta anormalidade apresenta 80% de correlação com anormalidades morfológicas totais.

Dentre outras anormalidades, BRANHAM (1969) constatou que a presença de gota protoplasmática na peça intermediária está associada a baixa velocidade de deslocamento do espermatozoide de coelhos. O acrossoma do espermatozoide de

coelhos é evidente como um inchaço na margem anterior da cabeça (GOULD *et al.*, 1971). As linhas que delimitam o segmento equatorial são muito mais juntas do que no hamster.

Objetivou-se neste trabalho verificar o efeito do ITU registrado em clima tropical, sobre a morfologia espermática de coelhos e os demais parâmetros seminais, bem como, conhecer as possíveis correlações entre esses parâmetros.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Setor de Cunicultura e no Laboratório de Estudos em Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia/UFC (Fortaleza, Ceará, Brasil) situado a 3°45'02" de Latitude Sul, 38°32'35" de Longitude Oeste a 15,5 m acima do nível do mar. O clima, segundo a classificação de Koeppen, é do tipo AW, quente e úmido, com média térmica de 26 °C, (variando de 19 °C a 30 °C), a umidade relativa do ar é de 82

% no litoral do estado do Ceará/Brasil.

O experimento foi conduzido de outubro a dezembro de 2009 e em maio de 2010, quando a temperatura do galpão experimental variou de 27,1 até 33,8 °C e a umidade relativa do ar de 53,1 até 72,9%. Essas variáveis foram obtidas com um termo-higrômetro digital de fabricação alemã, modelo 7429.02.0.00, importado pela Intercom e instalado na altura das gaiolas experimentais.

Foram utilizados 20 coelhos da raça Nova Zelândia Branca, idade média de oito meses e peso médio de 2.800 g, selecionados aleatoriamente. Durante o período experimental, os animais foram manejados em sistema intensivo, alojados individualmente em gaiolas de arame galvanizado, dispostas no sistema flat-deck, e alimentados com ração comercial peletizada. Semanalmente, o sêmen foi coletado com o uso de uma vagina artificial de vidro temperado e o com auxílio de uma

fêmea em estro como manequim. As coletas foram realizadas pela manhã, sendo que a temperatura e a umidade relativa foram mensuradas no início e no final do dia de coleta.

O Índice de Temperatura e Umidade (ITU) foi calculado pela fórmula proposta por Marai, Ayyat e Abd El-Monem (2001), adaptada para coelhos: $ITU = db^{\circ}C - [(0,31 - 0,31 RH) (db^{\circ}C - 14,4)]$, onde $db^{\circ}C$ é a temperatura em celsius e RH = umidade relativa em porcentagem/100. O ITU foi utilizado para medir o nível de conforto térmico no interior da instalação. Os valores encontrados de ITU foram classificados em: menor que 27,8 - ausência de estresse térmico; de 27,8 a 28,9 - estresse térmico moderado; de 28,9 a 30,0 - estresse térmico severo e superior a 30,0 - estresse térmico muito severo (MARAI, AYYAT e ABD EL-MONEM, 2001). Dessa forma, o ITU foi calculado por mês de coleta. Logo após cada coleta de sêmen foi

mensurada a temperatura retal dos coelhos utilizando-se um termômetro clínico digital.

Após a coleta do sêmen e a remoção da fração gel (quando presente) (IRRG, 2005), foram feitos esfregaços de sêmen das amostras de cada animal para observação das possíveis alterações morfológicas provocadas pelos diferentes ITU's. Os esfregaços foram corados com solução de azul de bromofenol. Um total de 200 células foi avaliado em microscopia óptica de imersão (1000 X). A morfologia espermática foi classificada segundo Blom (1973) em normais (NOR), defeitos maiores (DEMA) e defeitos menores (DEME), expressos em números reais.

O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado. Para se avaliar o efeito do índice de temperatura e umidade (ITU) sobre a morfologia espermática, os dados foram submetidos a análise de

variância e quando foram encontradas diferenças, as médias foram ajustadas pelo programa estatístico e comparadas pelo teste de Duncan com 5% de probabilidade de erro. Realizou-se ainda, o estudo das correlações simples de Pearson para verificar o grau de associação entre os parâmetros seminais de coelhos e o ITU. Para a análise dos dados utilizou-se o programa estatístico SAS versão 9.1 (2003).

Resultados e Discussão

Para avaliar se os animais estavam sob o efeito de estresse térmico, foi calculado o índice de temperatura e umidade (ITU), permitindo assim verificar que nos meses de outubro e novembro, os animais estavam com ausência de estresse térmico, entretanto em dezembro e maio o estresse térmico foi moderado e muito severo, respectivamente (MARAI, AYYAT e LEBAS, COUDERT E ROUVIER (1997) afirmaram que

ABD EL-MONEM., 2001). A temperatura retal (Tabela 1) variou de 39,48 a 39,74 °C. Apesar da pequena variação a temperatura retal foi significativamente ($p < 0,05$) mais elevada em maio e novembro, respectivamente, meses com estresse térmico muito severo e com ausência de estresse térmico, consecutivamente. A temperatura corporal média do coelho está em torno de $39,5 \pm 0,2$ °C (FAYEZ *et al.*, 1994; JILGE *et al.*, 2000), ou seja, apesar do ITU está elevado, a temperatura corporal estava dentro da normalidade. Este achado demonstrou que os animais estão perfeitamente adaptados às condições do Nordeste brasileiro. Essa adaptação pode ser explicada pelo local de origem dos coelhos, já que o clima do Norte da África é similar ao do Nordeste brasileiro.

somente temperaturas ambiente acima de 30°C afetam significativamente a

libido e a qualidade espermática. Entretanto, estes animais reproduzem-se

eficientemente em climas equatorial e tropical quente.

Tabela 1: Média da morfologia espermática e temperatura retal de coelhos.

Parâmetros	Mês			
	Maio	Outubro	Novembro	Dezembro
Normais (n°)	148,75	168,97	179,19	175,47
Defeitos maiores (n°)	27,24 ^a	16,42 ^b	6,28 ^d	9,60 ^c
Defeitos menores (n°)	23,61 ^a	14,61 ^b	14,53 ^b	14,93 ^b
Temperatura retal (°C)	39,72 ^a	39,48 ^c	39,74 ^a	39,58 ^b
Temperatura Ar (°C)	28,44	28,92	29,23	29,34
Umidade Relativa (%)	76,43	63,38	63,51	68,37
ITU	31,44	27,27	27,54	27,87

Letras minúsculas: diferença entre meses no mesmo parâmetro.

ROCA *et al.* (2005) também utilizaram o ITU proposto por MARAI, AYYAT E ABD EL-MONEM (2001) para medir o índice de conforto térmico dentro da instalação. Segundo ROCA *et al.* (2005), a produção de espermatozoides permanece estável quando o ITU está localizado entre 15 a 20, começando a decrescer quando o mesmo se aproxima de 30. Além disso,

com a exposição dos animais a um ambiente de desconforto térmico, onde a temperatura e a umidade são elevadas, se observa a diminuição tanto dos parâmetros produtivos como dos reprodutivos desta espécie (SZENDRÓ, PAPP e KUSTUS, 1999).

No que se refere à morfologia espermática de coelhos, constatou-se que os índices de Defeitos Maiores e

Menores foram significativamente maiores no mês de maio, período de estresse térmico muito severo. O estudo de correlação de Pearson encontrou relação positiva e altamente significativa dos defeitos maiores ($r=0,36$) e menores ($r=0,22$) com o ITU, o que reforça a importância dos resultados encontrados no presente experimento. Assim, pode-se afirmar que o ITU é um parâmetro que deve ser considerado ao realizar-se estudos de avaliação da morfologia espermática de coelhos em clima tropical. Em maio, o total de anormalidades morfológicas ultrapassou o máximo recomendado para esta espécie que é de 18% (KUZMINSKY *et al.*, 1996), ou seja, foi encontrado 25,17%. Nos demais meses, o percentual de anormalidades total ficou em torno de 16%. Outro trabalho também encontrou um total de anormalidades em torno de 25% quando os animais foram submetidos a temperaturas de 30°C por 22 h

consecutivas por quatro semanas (FINZI *et al.*, 1995).

Ainda segundo Kuzminsky *et al.* (1996), há uma alta correlação entre o total das anormalidades morfológicas e os defeitos de flagelo, pois este defeito constituiu mais de 13% dos defeitos encontrados no sêmen de coelhos. Essa afirmação é confirmada no presente trabalho nos meses de maio e outubro, pois a frequência de espermatozoides com defeitos de flagelo foram 14,4%, e 16,81%, respectivamente. Todavia, nos meses de novembro e dezembro, os defeitos de flagelo corresponderam, respectivamente, a 4% e 9% do total das anormalidades. Apesar de não ter havido estresse térmico em outubro, no mês anterior (ARRUDA-ALENCAR, 2011) houve estresse térmico moderado na última semana de setembro. PEREZ-SANCHEZ, TABLADO E SOLER (1997) afirmaram que a incidência de espermatozoides com defeito de flagelo é muito baixa durante a formação e

armazenamento no epidídimo, assim acredita-se que o aumento de espermatozoides com defeito de flagelo nesse experimento tenha ocorrido durante a ejaculação. Entretanto, esses resultados sugerem que a alta incidência dos defeitos de flagelo observada nos ejaculados obtidos no mês de maio pode ser atribuída a fatores ambientais e até do próprio animal, pois o ITU (31,44) e a temperatura retal (39,72) estavam significativamente elevados nesse período. Os resultados do atual experimento demonstraram a fragilidade das células espermática de coelhos a temperaturas mais baixas do que o relatado por FINZI *et al.* (1995). Esses autores afirmaram que as anormalidades morfológicas dos espermatozoides podem ser utilizadas como indicadores de condições de estresse térmico sofridas pelos animais. Todavia, não foi possível encontrar uma razão para explicar a maior incidência

de defeitos de flagelos encontrada em outubro.

Conclusões

O estresse térmico afetou negativamente a morfologia espermática de coelhos aumentando a incidências de anormalidades nas células espermáticas.

Referências Bibliográficas

- ARRUDA-ALENCAR, J.M. **Parâmetros seminais e composição bioquímica do plasma seminal de coelhos criados no nordeste do Brasil**, 54p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará. 2011.
- ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE CRIADORES DE COELHOS. **A criação de coelhos**. Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/apcc0001.htm>>, acesso em 05/02/2013 às 13:45 h.
- BEDFORD. J. M. Morphological changes in rabbit spermatozoa during

- passage through the epididymis. **Journal Reproduction Fertility**, v. 5, p. 169-177, 1963.
- BRANHAM, J.M. Movements of free-swimming rabbit spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility** 18: 97-105, 1969.
- CUMMINS, J. M.; WOODALL, P. F. On mammalian sperm dimensions. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 75, p. 153-175, 1985.
- EDDY, E.M. The Spermatozoon. p. 3-54. In: **Physiology of Reproduction**. Knobil and Neill's Ed. Third Edition. p. 3230, 2006.
- FAYEZ I., MARAI M., ALNAIMY A., HABEEB M. **Thermoregulation in rabbits**. Chaiers Options, Mediterranéennes, Vol. 8. 33-41, 1994.
- FINZI, A., MORERA, P.; KUZMINSKY, G., Sperm abnormalities as possible indicators of rabbit chronic heat stress. **World Rabbit Sci**, 3: 157-161, 1995.
- GOULD, K.G.; ZANEVELD, L.J.D.; WILLIAMS, W.L., Scanning Electron Microscopy of Mammalian Gametes. **Arch Gynäkovi**, 210: 235-250, 1971.
- GRAVANCE, C. G.; DAVIS, R.O. Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 88-93, 1995.
- IRRG – International Rabbit Reproduction Group. **Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen**. World Rabbit Science, v. 13, p. 71 – 91, 2005.
- JILGE, B.; KUHNT, B.; LANDERER, W.e REST, S. **Circadian thermoregulation in suckling rabbit pups**. J. Biol. Rhythm, 15, 329–335, 2000.
- KUZMINSKY, G., FAUSTO, A.M.; MORERA, P., Morphological abnormalities of rabbit spermatozoa studied by scanning electron microscope and quantified by light microscope. **Reprod Nutr Dev**, 36, 565-75, 1996.

- LAVARA, R.; GARCÍA, M.L.; TORRES, C.; VICENTE, J.S.; BASELGA, M. **Genetic parameters for semen traits of rabbit males: II. Motility.** In: World Rabbit Congress, 9, Anais... Verona: Itália, p. 159- 162 ,2008a
- LEBAS, F.; COUDERT, P.; ROUVIER, R., **Rabbit husbandry, health and production.** Animal Production and Health Series, FAO, Rome. 1997.
- MARAI, I.F.M., AYYAT, M.S., ABD EL-MONEM, U.M. Growth performance and reproductive traits at first parity of New Zealand White female rabbits as affected by heat stress and its alleviation under Egyptian conditions. **Tropical Animal Health and Production**, v. 33, n. 6, p. 451-462, 2001.
- PEREZ-SANCHEZ, F., TABLADO, L., SOLER, C. Sperm morphological abnormalities appearing in the male rabbit reproductive tract. **Theriogenology**, 47, 893-901, 1997.
- PHILLIPS, D.M. Surface of the Equatorial Segment of the Mammalian Acrosome. **Biology of Reproduction**, v. 16, p. 128-137, 1977.
- ROCA, J.; MARTÍNEZ, S.; ORENGO, J.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A. Influence of constant long days on ejaculate parameters of rabbits reared under natural environment conditions of Mediterranean area. **Livestock Production Science**, v. 94, p. 169-177, 2005.
- SZENDRÓ, Z.S.; PAPP, Z.; KUSTUS, K. Effect of environmental temperature and restrict feeding on production of rabbit does. **Cahiers Options Méditerranéennes**, v. 41, p.11-17, 1999.