



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO E DA  
ESTAÇÃO DO ANO NAS  
CARACTERÍSTICAS DO SÉMEN DE  
COELHOS**

**Cláudia Alexandra Rodrigues Alago**

Orientação: Rui Miguel Carracha Charneca

Coorientação: Paula Maria Augusto de Azevedo

**Mestrado em Engenharia Zootécnica**

Dissertação

Évora, 2013



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**

**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

**INFLUÊNCIA DO GENÓTIPO E DA  
ESTAÇÃO DO ANO NAS  
CARACTERÍSTICAS DO SÉMEN DE  
COELHOS**

**Cláudia Alexandra Rodrigues Alago**

Orientação: Rui Miguel Carracha Charneca

Coorientação: Paula Maria Augusto de Azevedo

**Mestrado em Engenharia Zootécnica**

Dissertação

Évora, 2013

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo a comparação e a avaliação da influência da estação do ano sobre algumas características do sémen e performance reprodutiva de coelhos de dois genótipos. Numa exploração comercial intensiva de cunicultura foram utilizados 44 machos, 22 do genótipo Valenciano (VT) e 22 do genótipo Gigante Espanhol (GE), cujos ejaculados foram recolhidos e avaliados entre julho de 2012 e maio de 2013.

Os valores médios observados para os principais parâmetros foram de 0,7mL para o volume médio por ejaculado, de 4,7 para a motilidade massal (escala 0-5), 0,2 para o grau de aglutinação (escala 0-3), de 91 e 86% respetivamente para as percentagens de espermatozóides vivos e morfologicamente normais, de  $120 \times 10^6$  espermatozóides/mL para a concentração espermática e  $83 \times 10^6$  espermatozóides/mL para o número total de espermatozóides. A estação do ano teve influência significativa nas percentagens de espermatozóides vivos e morfologicamente normais, registando-se uma tendência, em certos casos significativa, para piores resultados no verão, quando comparado com outras estações do ano. O sémen dos machos GE apresentou uma maior concentração espermática e um maior número de total de espermatozóides, que o dos machos VT em todas as estações do ano. Analisando globalmente todos os resultados, podemos concluir que o efeito sazonal foi pouco marcado no período e condições do estudo.

**Palavras-chave:** Coelhos; sémen; sazonalidade; *Performance* reprodutiva.

**TITLE: Genotype and influence of season in semen characteristics of rabbits**

**ABSTRACT**

The present research aimed to study comparatively and evaluate the effects of season on some semen characteristics and reproductive performance of rabbits of two commercial genotypes. In a private rabbit farm 44 males were used: 22 of Valenciano (VT) and 22 of Gigante Espanol (GE). The ejaculates were collected from July 2012 until May 2013.

The mean values observed for the main semen parameters were 0,7mL for ejaculate volume, 4,7 for massal motility (scale 0-5), 0,2 for the degree of agglutination (scale 0-3), 91 and 86%, respectively for the percentages of live and normal spermatozoids,  $120 \times 10^6$  spermatozoids/mL for sperm concentration and  $83 \times 10^6$  spermatozoids/mL for the total number of sperm. The season influenced the live and normal spermatozoids, with a tendency, in some cases statistically significant for poor results during summer, when compared to other seasons. The semen of GE males presented higher sperm concentration and total number of sperm, than semen from VT males in all seasons. Globally, the season effect was not very marked for the period and study conditions.

**Keywords:** Rabbits; semen; seasonality; Reproductive performance.

# Índice Geral

	Página
RESUMO	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE GERAL	iii
ÍNDICE DE QUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
AGRADECIMENTOS	x

## *INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA*

I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
1. A CUNICULTURA NO MUNDO	2
2. O COELHO E A CUNICULTURA	4
3. A PRODUÇÃO DO COELHO	5
3.1. Genótipos	5
3.1.1. Produção de carne	5
3.2. Seleção e melhoramento em cunicultura	10
4. ORGANIZAÇÃO DA PRODUÇÃO INTENSIVA	13
4.1. Organização de uma Cunicultura	14
4.2. Proporção entre machos e fêmeas	16
4.3. Ritmo reprodutivo	17
5. FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO DE COELHOS	18
5.1. Características reprodutivas da coelha	18
5.1.1. Seleção, manejo e sazonalidade reprodutiva nas coelhas	22
5.2. Técnicas auxiliares de reprodução	24

5.2.1. Métodos de indução da recetividade e da ovulação na coelha	24
5.2.1.1. Indução da recetividade	24
5.2.1.2. Indução da ovulação	25
5.2.2. Inseminação artificial	26
5.2.3. Características fisiológicas e reprodutivas do macho	27
5.2.4. Avaliação e preparação do sémen do macho para a inseminação artificial	29
5.3. Maneio dos machos reprodutores	31
5.3.1. Fatores que influenciam a eficiência reprodutiva do coelho	32
5.3.1.1. Alimentação	32
5.3.1.2. Seleção e melhoramento	33
5.3.1.3. Conformação corporal	33
5.3.1.4. Idade e ritmo de recolha do sémen	33
5.3.1.5. Sazonalidade e ambiente da exploração	34

## ***COMPONENTE EXPERIMENTAL***

I. PARTE EXPERIMENTAL	39
1. ENQUADRAMENTO GERAL DO AMBIENTE EXPERIMENTAL	39
2. MATERAIS E MÉTODOS	39
2.1. Exploração	39
2.2. Animais	42
2.3. Recolha e avaliação laboratorial do sémen	43
2.4. Análises macroscópica e microscópica das amostras	44
2.5. Tratamento dos dados e análise estatística	48
3. RESULTADOS	49
4. DISCUSSÃO	56
5. CONCLUSÃO	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

## ANEXOS

ANEXO I - Ficha de recolhas de sémen	73
ANEXO II - Ficha de morfologia/anomalias espermáticas	75
ANEXO III - Protocolo câmara de Neubauer	77

## Índice de Quadros

<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>Página</b>
Quadro 1 - Produção mundial de carne de coelho, dados dos principais países produtores (milhões de quilograma)	3
Quadro 2 - Parâmetros reprodutivos das coelhas do genótipo Valenciana	8
Quadro 3 - Parâmetros reprodutivos das coelhas do genótipo Gigante Espanhol	10
Quadro 4 - Caracteres parentais transmissíveis à descendência	12
Quadro 5 - Número de partos por ano por cada número de bandas usadas	15
Quadro 6 - Proporção entre machos e fêmeas com cobrição natural em função da dimensão da exploração	16
Quadro 7 - Percentagens de fêmeas fecundadas quando submetidas a ritmos de reprodução intensivo e semi-intensivo	19
Quadro 8 - Influência da recetividade (medida pela coloração da vulva) na fertilidade à inseminação artificial	20
Quadro 9 – Parâmetros de avaliação do sémen de coelho em vários estudos. Para cada parâmetro são apresentados os valores limite de modo a dar uma ideia do seu espectro	28
Quadro 10 - Características comportamentais do sémen do genótipo VT	29
Quadro 11 - Características comportamentais e do sémen do genótipo Gigante Espanhol	29
Quadro 12 – Volume, motilidade individual, concentração espermática, % de espermatozoides vivos e % de morfo-anomalias espermáticas em estudos que tiveram a estação do ano como fator de variação	36
<b>Componente Experimental</b>	
Quadro 13 - Número de coelhos e respectivos genótipos de acordo com o local de ensaio	42
Quadro 14 - Não realização de saltos, saltos sem ejaculação e ejaculados rejeitados, expresso em número de animais, para cada genótipo	49
Quadro 15 - Estatística descritiva dos parâmetros macroscópicos	50
Quadro 16 - Estatística descritiva da totalidade dos parâmetros microscópicos	50
Quadro 17 - Estatística descritiva de parâmetros dos ejaculados dos machos Valenciana (VT)	51



Quadro 18 - Estatística descritiva de parâmetros dos ejaculados dos machos Gigante Espanhol (GE)	51
Quadro 19 - Parâmetros da avaliação espermática de acordo com o genótipo e a estação do ano	52
Quadro 20 - Coeficientes de correlação entre parâmetros do sémen	53
Quadro 21 - Resultados reprodutivos das coelhas dos genótipos VT e GE, durante o período de estudos	55

## Índice de Figuras

<b>Revisão Bibliográfica</b>	<b>Página</b>
Figura 1 - Efetivo de coelhos em Portugal e distribuição por regiões e sua evolução entre 2003 e 2009	4
Figura 2 - Composição da carne de coelho	6
Figura 3 - Coelho de genótipo Gigante de Flandres	6
Figura 4 - Coelho de genótipo Californiana	7
Figura 5 - Coelho de genótipo Holandês	7
Figura 6 - Macho e fêmea do genótipo Valenciano, respetivamente	8
Figura 7 - Macho e fêmea do genótipo Gigante Espanhol, respetivamente	9
Figura 8 - Origem do genótipo Gigante Espanhol	9
Figura 9 - Cruzamento de 3 ou 4 vias para obter os coelhos híbridos de carne	11
Figura 10 - Organização da Produção Intensiva	13
Figura 11 - Ritmo de reprodução semi-intensivo com cobertura 12 dias após o parto e desmame aos 32 dias	17
Figura 12 - Evolução da produtividade na produção de coelhos entre 1983 e 1996	18
Figura 13 - Evolução da taxa de recetividade da coelha no período de lactação	21
Figura 14 - Equipamento utilizado na Inseminação Artificial em cunicultura	27
Figura 15 - Aparelho reprodutor do macho	28
<b>Componente Experimental</b>	
Figura 16 - Caracterização do exterior e interior da exploração	41
Figura 17 - Genótipos da exploração	42
Figura 18 - Recolha e avaliação laboratorial do sémen	44
Figura 19 - Morfologia e anomalias espermáticas	46
Figura 20 - Câmara de <i>Neubauer</i>	47

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AG – Aglutinação

CONC – Concentração média

FAO - Food and Agriculture Organization

FSH - Follicle-stimulating hormone

GE – Genótipo Gigante Espanhol

IA – Inseminação Artificial

IPMA – Instituto Português do Mar e da Atmosfera

LH - Luteinizing hormone

MOTM – Motilidade massal

NV – Nascidos vivos

NTSPZ – Número total de espermatozóides

SED - Sedimentos

SPSS - Statistical Product and Service Solutions

SPZ – Espermatozóides

SPZ N – Espermatozóides normais

SPZ V – espermatozóides vivos

UE – União Europeia

VA – Vagina Artificial

VOL MED – Volume médio

VT – Genótipo Valenciano

## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração de várias pessoas às quais pretendo expressar o meu enorme reconhecimento e gratidão.

À empresa Al-Andalus e a todas as pessoas que nela laboram por toda a disponibilidade demonstrada, pela ajuda em todas as etapas realizadas neste trabalho e pela autorização e auxílio na recolha de dados e amostras.

Ao Senhor Professor Doutor Rui Miguel Carracha Charneca, por ter aceite a orientação científica deste trabalho, pelos inúmeros conselhos, críticas e sugestões e por todo o auxílio e estímulo dado para a realização de todas as fases do mesmo.

À Senhora Professora Doutora Paula Maria Augusto de Azevedo, por ter aceite ser coorientadora deste trabalho, e pela disponibilidade para o esclarecimento das muitas questões colocadas ao longo da redação desta tese.

Aos Senhores Professores do Mestrado em Engenharia Zootécnica, que auxiliaram na elaboração da redação da tese.

Aos meus amigos e amigas pelo apoio e incentivo ao longo da realização deste trabalho.

À minha família pelo constante incentivo, pela paciência e pelo empenho e força que sempre depositaram em mim.

A todos os que contribuíram para a realização deste trabalho.

*Labor improbus omnia vincit!*

## I. INTRODUÇÃO

O coelho como espécie pecuária não é muito valorizado. Portugal tem condições excepcionais para produção de coelho, pelo seu clima temperado, pela qualidade química da água que é a ideal, o que leva a que os resultados técnicos (produtivos), apresentados pelos produtores, sejam acima dos padrões normalmente descritos para o setor (Monteiro *et al.*, 2013).

A cunicultura sofreu nas últimas décadas transformações profundas, resultantes do conhecimento mais aprofundado do coelho e de todo o processo produtivo. O melhoramento dos alimentos compostos e da genética, o aperfeiçoamento dos equipamentos e das instalações, o progresso das técnicas de manejo e o conhecimento mais completo das patologias, com diagnósticos e terapêuticas mais eficazes, permite que hoje em dia as cuniculturas tenham dimensões e produtividades que eram impensáveis até há muito pouco tempo. A cunicultura, como as restantes atividades, tem sofrido a pressão do aumento dos custos de produção que não são acompanhados pelo aumento do preço do coelho vivo, obrigando o produtor a ser mais eficiente na sua atividade, a fim de fazer face à crise que o sector atravessa. Este é assim um setor estruturado, em constante evolução e modernização das estruturas produtivas (Monteiro *et al.*, 2013).

O coelho é uma espécie de interesse zootécnico onde, embora se tenha verificado um aumento nos últimos anos de investigação científica, a mesma ainda se revela escassa comparativamente com outras espécies (Monteiro *et al.*, 2013). O estudo das características e performance reprodutiva de machos e fêmeas em condições experimentais ou produtivas, revela-se portanto de particular interesse. Um dos aspetos particulares da eficiência reprodutiva e produtiva desta espécie prende-se com o facto de existirem, em muitos casos, efeitos sazonais. Assim, a presente dissertação tem como objetivos gerais contribuir para o aumento do conhecimento científico acerca dos aspetos acima referidos.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atendendo à relativa escassez de informação técnica e científica sobre coelhos, sobretudo quando comparada com outras espécies domésticas, e a ainda maior escassez de trabalhos científicos sobre esta espécie em Portugal, apresentamos nesta revisão alguns aspetos sobre a cunicultura e manejo reprodutivo em cunicultura que, embora estejam relacionados, não estão especificamente ligados ao estudo efetuado.

### 1. A CUNICULTURA NO MUNDO

A cunicultura é um setor de produção animal singular. Na atual situação comunitária não dispõe de uma Organização Comum dos Mercados específica (OCM específica) e tem uma participação débil na Organização Comum dos Mercados única (OCM única), o que gera discriminação relativamente aos outros setores agrários (Monteiro *et al.*, 2013).

Portugal é ainda um país deficitário na produção de carne de coelho, sendo a Espanha nosso natural fornecedor, pela proximidade e pelo facto de serem excedentários. A Espanha comercializa carne de coelho para diversos países, sendo os principais França, Bélgica e Portugal. Existe no nosso país uma quota muito elevada de autoconsumo que é difícil de quantificar, e na maioria dos países não existe um sistema de recenseamento das explorações que permita a compilação de informação (Monteiro *et al.*, 2013). Este panorama proporciona a ocorrência de algumas discrepâncias entre os dados estatísticos oficiais e as produções médias de cada país, apresentadas por alguns autores ou mesmo pelas associações de cunicultores (Carvalho, 2009).

A produção mundial de carne de coelho estimada pela Food and Agriculture Organization (2009) é superior a 1,5 milhões de toneladas. Cerca de três quartos da produção mundial de carne de coelho são assegurados pela China, Itália, França, Espanha e Portugal (Quadro 1). A China é o principal produtor, com mais de 40% do total mundial, seguida da Europa com 30%. A UE27 em 2010 alcançou as 332.000 toneladas o que corresponde a 28% do total mundial. A Itália é o primeiro produtor europeu e o segundo mundial, a Espanha é o segundo produtor europeu (Monteiro *et al.*, 2013).

**Quadro 1.** Produção mundial de carne de coelho, dados dos principais países produtores (milhares de toneladas).

<b>Produção mundial de carne de coelho. Principais países produtores</b>					
<b>(milhares de toneladas)</b>					
	<b>2006</b>	<b>2007</b>	<b>2008</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>
China	544,8	604,0	666,0	663,0	----
Bélgica – Luxemburgo	15,0	12,0	10,0	10,0	10,0
República Checa	25,3	23,3	20,8	18,0	18,0
Espanha	72,3	74,7	61,0	61,2	63,2
França	105	102	97,0	93,0	91,0
Itália	125,0	132,0	132,0	130,0	130,0
Portugal	14,2	16,1	16,8	14,9	14,7

**Fonte:** Adaptado de Monteiro *et al.* (2013).

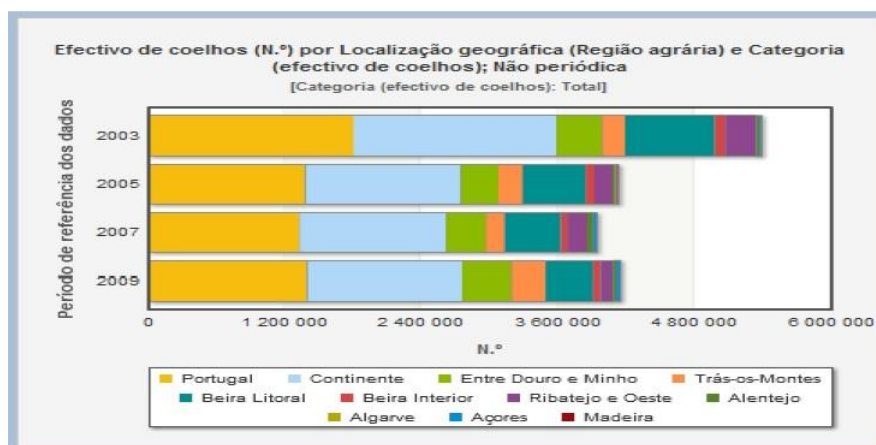
Os países latinos são tradicionalmente consumidores de carne de coelho. De acordo com os dados apresentados por European Food Safety Authority (2005) o consumo em Portugal ronda 1,7 kg por habitante e por ano.

A quantificação da produção de carne de coelho é uma tarefa complicada, na medida em que os dados estatísticos oficiais são escassos ou não contêm muita informação, por estarem agrupados com a produção de outras espécies. Segundo dados do Instituto Nacional de Estatísticas, INE (2011), o peso limpo total de coelhos abatidos e aprovados para consumo foi de 691 toneladas, o que representa uma quebra de 20,9% do número de coelhos abatidos face ao mês homólogo de 2010.

Inicialmente havia uma maior incidência de cuniculturas nas zonas de Viseu, Leiria e Oliveira de Frades. Posteriormente, outras zonas adquiriram grande importância como a região de Trás-os-Montes e Alto Douro e Minho (Mourão, 2003; Carvalho, 2011).

Apesar da importância da região Norte na cunicultura nacional (Figura 1), não existe um centro de abate nesta área. Os matadouros encontram-se nos distritos de Lisboa, Leiria, Coimbra e Aveiro, existindo ainda duas empresas espanholas com grande quota de mercado (Cunicarne e Cogal).





**Figura 1.** Efetivo de coelhos em Portugal, distribuição por regiões e sua evolução entre 2003 e 2009.

**Fonte:** Adaptado de Monteiro *et al.* (2013).

A produção de carne de coelho tem diminuído de ano para ano como ilustra a figura anterior. Nos países europeus produtores, a cunicultura está a atravessar um importante processo de recessão, com a diminuição da rentabilidade das empresas, quer na fase de produção quer de transformação, devido ao aumento dos custos de produção. Estes custos não são compensados pelos preços praticados, nem ao cunicultor, nem ao matadouro (Monteiro *et al.*, 2013).

## 2. O COELHO E A CUNICULTURA

O coelho doméstico é um mamífero herbívoro da Ordem *Lagomorpha* e da Família *Leporidae* que teve origem na Península Ibérica, em Espanha. É portanto um lagomorfo e não um roedor, embora exteriormente os lagomorfos se assemelhem a roedores. Porém há diferenças que justificam a sua inclusão numa ordem à parte. Elas são: quatro (em vez de dois) dentes incisivos na maxila, o escroto do macho está à frente do pénis e este não apresenta osso peniano como o dos roedores (Hoffman e Smith, 2005).

Existem vários genótipos, mas é do coelho silvestre (*Oryctolagus cuniculus*) que derivam as múltiplas variedades utilizadas na cunicultura industrial (Rosell, 2000; Meredith e Crossley 2002; Venâncio *et al.*, 2007).

A impossibilidade de reprodução entre diferentes espécies de lagomorfos, faz com que não exista nenhum verdadeiro híbrido. Os coelhos vulgarmente designados de “híbridos” são resultantes de cruzamentos entre genótipos que pertencem à espécie *Oryctolagus cuniculus* (Carvalho, 2009).

Embora nos dias de hoje, a cunicultura seja realizada na maior parte dos casos com o objetivo de produzir carne, existe um número crescente de explorações em que o objetivo é a produção de peles ou a produção de pêlo. Nestes casos, as técnicas de manejo são específicas, e os genótipos dos coelhos utilizados são especializados nestas produções.

### **3. A PRODUÇÃO DO COELHO**

#### **3.1. Genótipos**

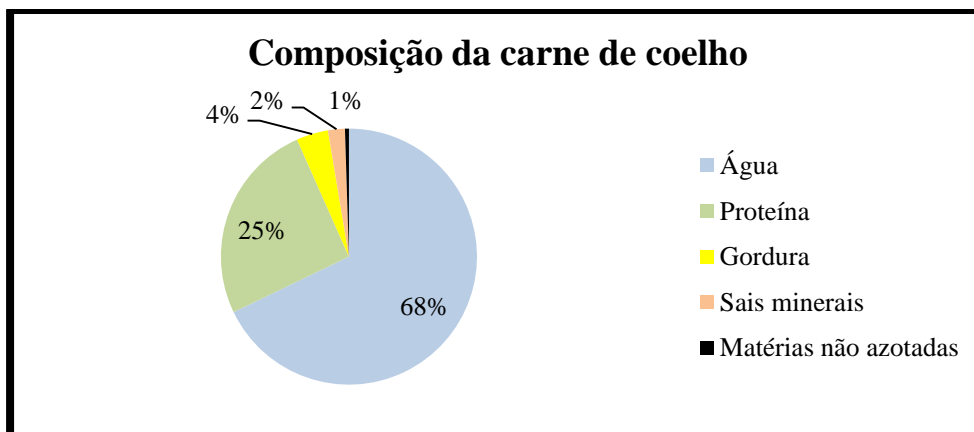
São vários os objetivos que devemos ter em vista quando encaramos uma exploração cunícola. Quer se trate de produtos da exploração ou dos seus subprodutos, devem ver aproveitadas todas as potencialidades do coelho (Oliveira, 1979).

Podemos encontrar três tipos diferentes de genótipos de coelho: os genótipos obtidos por seleção artificial, a partir de animais que descendiam diretamente de coelhos selvagens; os genótipos sintéticos obtidos por cruzamento ordenado de animais de diversos genótipos e os genótipos mendelianos obtidos por fixação de caracteres, com determinação genética simples e resultante de uma mutação (Mourão, 2003).

Os genótipos do coelho também podem ser divididos em função da sua aptidão produtiva: produção de carne, produção de pêlo e produção de pele. Dado que a produção de pêlo e pele têm reduzida expressão em Portugal e que os animais estudados no presente trabalho se destinam à produção de carne, é sobre esta que daremos, de seguida, informações zootécnicas.

##### **3.1.1. Produção de carne**

A carne de coelho é de uma riqueza bastante assinalável, uma vez que é composta essencialmente por água, proteína e pouca gordura (Figura 2), o que faz com que esta tenha um baixo valor de colesterol.



**Figura 2.** Composição da carne de coelho.

**Fonte:** Adaptado de Oliveira (1979).

Em função do peso corporal dos animais adultos, os genótipos de coelhos para produção de carne podem ser agrupados de acordo com Mourão (2003) em:

**a) Genótipos pesados** (peso adulto superior a 5 kg) – têm, em geral, baixa fecundidade e rusticidade. Neste grupo existem diversos genótipos como o *Belier Francês*, a Gigante Mariposa, o Gigante Espanhol e o Gigante de Flandres (Figura 3) que é o maior de todos. Estes genótipos, quando são utilizados na cunicultura intensiva, entram mais frequentemente na formação da linha paterna, com o objetivo de transmitir à sua descendência um ritmo de crescimento elevado.



**Figura 3.** Coelho de genótipo Gigante de Flandres.

**Fonte:** [cuniculturamussoi.blogspot.com](http://cuniculturamussoi.blogspot.com)

**b) Genótipos médios** (peso entre 3,5 e 5kg) - a maior parte das populações ou genótipos de coelhos utilizados na produção intensiva derivam destes genótipos, o que faz com que estes se tenham tornado o grupo de genótipos mais numeroso. São genótipos vocacionados para a produção de carne devido à sua capacidade de crescimento e relação carne/osso melhor do que nos genótipos pesados.

Apresentam ainda boa fertilidade e precocidade (puberdade entre 4 e 5 meses). Exemplos: Californiana (Figura 4), Valenciano, Neozelandesa, Fulvo da Borgonha e Prateada de Champanhe.



**Figura 4.** Coelho de genótipo Californiana.

**Fonte:** bichoonline.com.br

c) **Genótipos ligeiros** (peso entre 2,5 e 3,5 kg) - têm um desenvolvimento corporal precoce, boas aptidões maternas mas as suas características reprodutivas, particularmente a prolificidade, são variáveis. O seu potencial de crescimento é reduzido, pelo que são pouco usados para a produção de carne. Exemplos: Holandês (Figura 5), Pequeno Russo e Polaco.



**Figura 5.** Coelho de genótipo Holandês.

**Fonte:** docescoelhos.bravehost.com

Para um maior conhecimento acerca de outros genótipos e percepção da variabilidade de resultados reprodutivos e produtivos existente, sugerimos a consulta do estudo de Bolet *et al.* (2004) onde se compararam zootecnicamente vários genótipos de tamanho médio e pequeno.

Os genótipos utilizados no presente estudo foram o Valenciano (VT) e o Gigante espanhol (GE).

## VALENCIANO

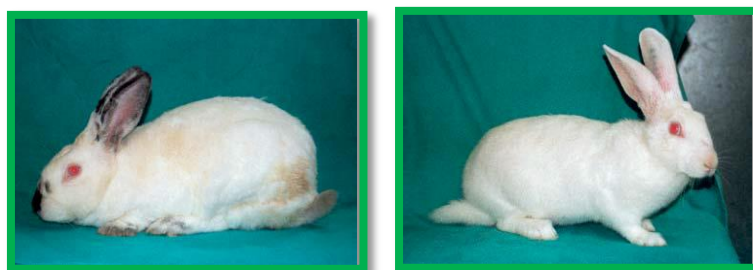
Este genótipo teve origem em Espanha (Valência). Foi criado em 1981 como um genótipo sintético, cruzando animais que descendiam de quatro genótipos maternos especializados. Após três gerações sem seleção, a linha foi escolhida para um melhor peso ao desmame das crias (Estany *et al.*, 1989). É então um genótipo maternal especializado, para ser cruzado com um genótipo paterno, a fim de se obter uma maior produção de carne.

No quadro 2 apresentam-se alguns valores relativos à performance reprodutiva das fêmeas deste genótipo. Os valores relativos às características dos machos serão apresentados mais adiante. Na figura 6 apresentam-se fotos de reprodutores deste genótipo.

**Quadro 2.** Parâmetros reprodutivos das coelhas do genótipo Valenciano.

Parâmetros reprodutivos	Média	Fonte
Taxa de concepção (%)	78	Baselga <i>et al.</i> (1992)
Intervalo entre partos (dias)	47,5	Baselga <i>et al.</i> (1992)
Taxa de ovulação (%)	14	Cifre <i>et al.</i> (1994)
Nascidos totais por parto	9,1 -11,6*	Gómez <i>et al.</i> (1999)
Nascidos vivos por parto	8,5 – 10,9*	Gómez <i>et al.</i> (1999)
Desmamados por parto	7,1 – 9*	Gómez <i>et al.</i> (1999)

\* dependentes do número de ordem de parto das fêmeas e da estação do ano



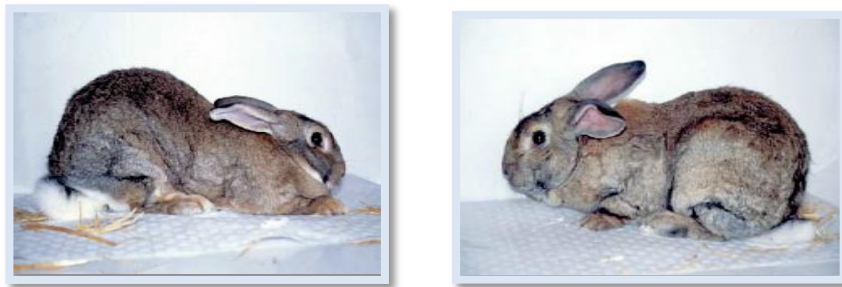
**Figura 6.** Macho e fêmea do genótipo Valenciano, respetivamente.

**Fonte:** <http://www.iamz.ciheam.org/medrabbt/spain/v/v.htm>

Valência tem verões longos, quentes e muito húmidos. Este genótipo tem sido criado em países de tempo quente, mantendo *performances* aceitáveis (Yamani, 1994; Testik, 1996).

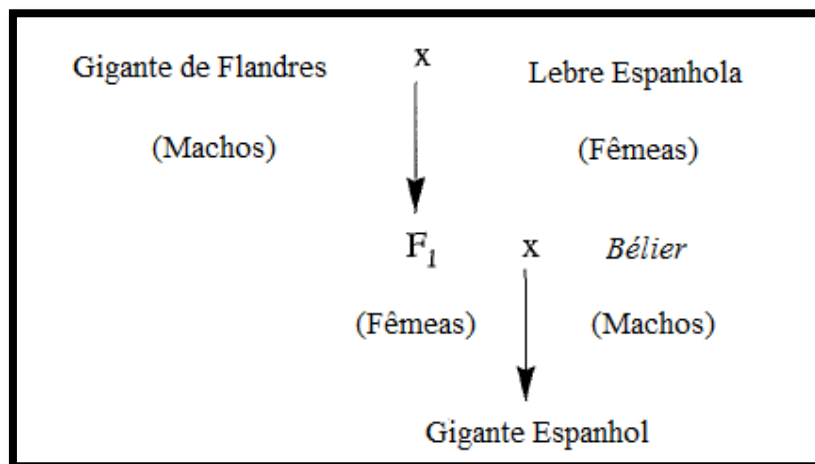
## GIGANTE ESPANHOL

O genótipo Gigante Espanhol (Figuras 7 e 8) foi criado no início do século XX, também na região de Valência. Era criado em várias quintas de cunicultura espanholas, mas os seus números decresceram drasticamente, devido ao aparecimento de outros genótipos comerciais. Como resultado, foi criado um programa de recuperação e conservação (Baggeto, 1918; Lacomba, 1919).



**Figura 7.** Macho e fêmea do genótipo Gigante Espanhol, respetivamente.

**Fonte:** <http://www.iamz.ciheam.org/medrabbbit/spain/gigante/gigante.htm>



**Figura 8.** Origem do genótipo Gigante Espanhol.

**Fonte:** <http://om.ciheam.org/om/pdf/a08/91605035.pdf>

No quadro 3 apresentam-se alguns valores relativos à performance reprodutiva das fêmeas deste genótipo. Os valores relativos às características dos machos serão apresentados mais adiante.

**Quadro 3.** Parâmetros reprodutivos das coelhas do genótipo Gigante Espanhol.

<b>Parâmetros reprodutivos</b>	<b>Média</b>	<b>Fonte</b>
Taxa de fecundidade (%)	74	López <i>et al.</i> (1994)
Intervalo entre partos (dias)	50	López <i>et al.</i> (1994)
Intervalo entre partos (dias)	46	Sierra e Lopez (1990)
Taxa de ovulação (%)	8,6	López <i>et al.</i> (1994)
Nascidos totais por parto	8,16	Sierra e Lopez (1990)
Nascidos totais por parto	8,8	López <i>et al.</i> (1994)
Nascidos vivos por parto	7,71	Sierra e Lopez (1990)
Nascidos vivos por parto	8,0	López <i>et al.</i> (1994)
Desmamados por parto	5,78	Sierra e Lopez (1990)
Desmamados por parto	6,5	López <i>et al.</i> (1994)
Mortalidade entre o nascimento e o desmame (%)*	29,2* e 21,5	Sierra e Lopez (1990)

\* Os autores revelam que a elevada mortalidade foi devida às baixas temperaturas invernais tendo em conta a inexistência de assistência térmica aos láparos aquando do nascimento. O valor de 21,5% já representa a existência de um complemento térmico.

### **3.2. Seleção e melhoramento em cunicultura**

O melhoramento do coelho como animal de interesse zootécnico iniciou-se no século XVIII, tendo sido definidos e caracterizados os principais genótipos do coelho até ao início do século XX. Até ao fim da década de cinquenta desse século, os critérios utilizados na seleção dos animais e na criação dos genótipos eram a morfologia corporal, o tamanho do animal, a cor e o padrão da pele, entre outros, sendo raramente prioritários os critérios zootécnicos. Todavia, este melhoramento inicial teve uma grande importância, pois criou diversos genótipos de coelhos com uma grande variabilidade genética, que, atualmente, servem de base ao melhoramento e seleção do coelho (Mourão, 2003) (Figura 9).

	Cruzamento de 3 vias			Cruzamento de 4 vias			
	estirpe macho	estirpes fêmea		estirpes macho	estirpes fêmea		
Estirpes puras	♂A × ♀A	♂C × ♀C	♂D × ♀D	♂A × ♀A	♂B × ♀B	♂C × ♀C	♂D × ♀D
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Avós (GP)	♂A × ♀A	♂C × ♀D		♂A × ♀B	♂C × ♀D		
	↓	↓		↓	↓		
Pais (Parents) F1	♂A	×	♀CD	♂AB × ♀CD			
		↓		↓			
Coelho híbrido F2	ACD			ABCD			

**Figura 9.** Cruzamento de 3 ou 4 vias para obter coelhos híbridos de carne.

**Fonte:** Adaptado de Mourão (2003).

Desde o início dos anos sessenta do século XX os programas de seleção e melhoramento do coelho, desenvolvidos por firmas privadas e por instituições públicas (*Institut National de Recherche Agronomique* - INRA por exemplo), chegaram à conclusão de que o aumento rápido e eficaz da produtividade do coelho exigia um sistema de dupla hibridação onde seriam utilizadas três ou quatro estirpes parentais. Uma estirpe é definida como uma população geneticamente fechada com um efetivo limitado (Mourão, 2003).

Num primeiro grau de hibridação seriam utilizados coelhos de genótipos parentais puros (genótipos do *Grand Parent stock* ou genótipos GP) para obter os pais dos coelhos de carne (*Parent stock*), que no caso da fêmea seria obrigatoriamente um híbrido de primeiro grau (F1) e no caso do macho poderia ser híbrido F1 ou genótipo puro. De seguida, os coelhos do *Parent Stock* seriam utilizados na produção dos coelhos de carne, que seriam sempre genótipos de segundo grau (F2). Desde então iniciou-se a seleção dos genótipos parentais para serem utilizados nos cruzamentos de dupla hibridação (Mourão, 2003).

Para selecionarem os genótipos parentais, os selecionadores caracterizaram numa primeira fase os genótipos de coelhos mais prometedores em função dos seus desempenhos zootécnicos. Seguidamente, selecionaram diversos genótipos de coelhos, entre os quais se destacam a Neozelandesa e a Californiana, entre outros.

Dentro de cada genótipo, o valor genético dos candidatos à seleção é determinado medindo os caracteres com interesse zootécnico e conhecendo a sua genealogia. A medição é fácil em alguns caracteres que são diretamente medidos no animal (tamanho da ninhada, ganho de peso, etc.) e nestes, em geral, a seleção individual pode ser utilizada. A medição é complicada nos caracteres que não podem ser



medidos no indivíduo (relação músculo/osso da carcaça, rendimento de carcaça, etc.), para os quais é utilizada a seleção sobre a descendência ou sobre os colaterais. Nos coelhos selecionados procura-se também eliminar características indesejáveis, como genes letais ou outros (Mourão, 2003).

Para se obter um progresso mais rápido na seleção, foram definidas prioridades diferentes na seleção dos genótipos parentais macho e fêmea. Assim, os caracteres parentais transmissíveis à descendência estão apresentados no quadro 4.

**Quadro 4.** Caracteres parentais transmissíveis à descendência.

<b>Machos</b>	<b>Fêmeas</b>
Fertilidade	Longevidade
Índice de conversão	Prolificidade
Velocidade de crescimento	Qualidades leiteiras
Rendimento, conformação e qualidade da carcaça	Instinto maternal

**Fonte:** Adaptado de Oliveira (1979).

O primeiro programa de melhoramento genético ocorreu em França, no INRA. Alguns anos depois iniciaram-se programas de seleção em Espanha, no IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) e na UPV (Universidad Politècnica de València). Em Itália e Portugal não se conhecem programas de melhoramento genético desenvolvidos por organismos institucionais (Rosell, 2004).

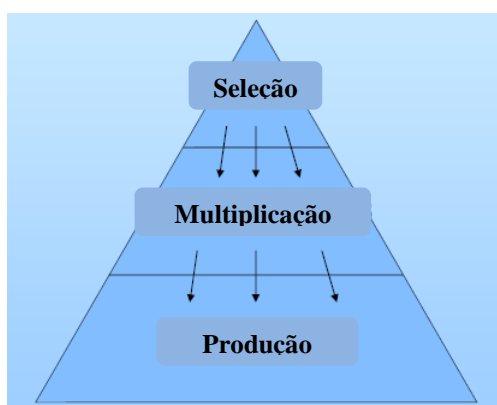
Também a partir de França, a sociedade dirigida por F. Coisne comercializa desde 1985 o genótipo *Hycole* e a firma Eurolap o genótipo *Hyla*. Os programas de seleção em Espanha, levados a cabo pela UPV e pelo IRTA, deram origem aos genótipos Valenciana e Prateado. Também em Espanha, as explorações Can Rafael (família Freixer-Palau), implantaram um programa de melhoramento genético e difundiram o genótipo *Hycat* (Rosell, 2004).

#### 4. ORGANIZAÇÃO DA PRODUÇÃO INTENSIVA

Os objetivos de seleção e melhoramento genético do coelho, são escolhidos tendo em conta os fatores que mais afetam a produtividade e rendimento da exploração.

Os custos mais importantes da exploração intensiva de coelhos resultam da alimentação dos animais pelo que o melhoramento em geral se concentra sobre os fatores que, direta ou indiretamente, permitem reduzir os custos de alimentação. Todavia, além do critério económico são utilizados outros critérios na seleção.

O melhoramento genético do coelho e a utilização generalizada de diversos génotipos de coelhos nas explorações de produção intensiva levou à criação de uma estrutura piramidal no sector da produção intensiva (Figura 10), na qual podemos encontrar os escalões da seleção, multiplicação e produção (Mourão, 2003).



**Figura 10.** Organização da Produção Intensiva.

**Fonte:** <http://www.mastergr.upv.es/Asignaturas/Apuntes/10.%20Programas/MA.pdf>

**Seleção:** As empresas de seleção cunícola estudam e determinam todo o programa de seleção e melhoramento que tem como objetivo produzir o coelho híbrido para a produção de carne, segundo os moldes anteriormente referidos.

Para a difusão dos reprodutores (*Parent Stock*), os centros de seleção fornecem os animais GP (*Grands-Parents*) selecionados de um só sexo (machos dos génotipos A e C e fêmeas dos génotipos B e D ou só D) a multiplicadores, em geral associados à empresa de seleção. Em alguns casos, para aumentar o potencial de difusão dos animais GP, os selecionadores podem fornecer às empresas de multiplicação os pais dos GP para estas empresas produzirem também os animais GP (Mourão, 2003).

Explorações de Multiplicação: O progresso genético criado e acumulado na seleção é difundido para a produção através das explorações de multiplicação, controladas técnica e sanitariamente pelo centro de seleção.

Os multiplicadores, recebem dos selecionadores os coelhos de genótipos GP e cruzam-nos de acordo com o plano de cruzamento definido pelo selecionador. Os descendentes resultantes (*Parent Stock*), machos de genótipos puros (machos A) ou híbridos de primeiro grau (machos AB) e as fêmeas híbridas de primeiro grau (CD) são vendidos aos produtores do coelho de carne (Mourão, 2003).

Explorações de Produção: As explorações de produção adquirem os machos e as fêmeas do *Parent Stock* às explorações de multiplicação. Seguindo o programa definido pela seleção, cruzam estes machos e fêmeas e produzem o coelho de carne híbrido de segundo grau (machos e fêmeas ABCD), que em Portugal são criados e engordados até cerca das 10 semanas de idade. A esta idade os coelhos pesam cerca de 2,3 kg e têm carcaças com cerca de 1,3 kg. O rendimento em carcaça deve ser próximo de 62%.

Muitas vezes, os cunicultores além de comprarem os reprodutores do *Parent Stock*, compram também coelhos GP de aptidão materna, para garantirem a renovação do seu efetivo reprodutor durante o ciclo de produção (Mourão, 2003).

#### **4.1. Organização de uma cunicultura**

A incorporação do sistema de manejo em banda representou uma verdadeira revolução na cunicultura. A possibilidade de ter um elevado número de fêmeas no mesmo estado fisiológico e um grupo de coelhos de engorda com a mesma idade, alterou drasticamente a maneira de se produzir coelho. A partir deste momento podem-se criar zonas, ou mesmo instalações, específicas para cada grupo onde se pode propiciar aos animais as condições ótimas de produção. Isto levou a uma evolução entrelaçada, dado que implicou o empenho de todos, desde a indústria de alimentos compostos, da genética, das instalações e equipamentos e claro está, da comunidade científica (Carvalho, 2009).

A aplicação do sistema em banda e o aumento da dimensão das explorações contribuiu para a implantação generalizada da inseminação artificial. É praticamente impossível reproduzir mais de 100 fêmeas por monta natural no mesmo dia e portanto a

inseminação artificial foi facilmente aceite pelos cunicultores, substituindo a monta natural (Maertens, 2000).

Os tipos de banda que podem ser utilizados são os seguintes:

- ✓ Banda semanal - as tarefas principais da exploração são repetidas todas as semanas;
- ✓ Banda quinzenal - as tarefas principais repetem-se a cada duas semanas, o que quer dizer que se a beneficiação for feita à sexta-feira, na semana seguinte esta não ocorre;
- ✓ Banda a 21 dias - as tarefas são repetidas de três em três semanas;
- ✓ Banda única - todas as coelhas da exploração encontram-se numa só banda e em igual estado fisiológico.

A título de exemplo, numa cunicultura com 1200 fêmeas reprodutoras, ou seja 1200 jaulas com ninho, em função do ritmo reprodutivo é possível obter-se o número de partos com frequências diferentes de acordo com o número de bandas proposto (Quadro 5).

**Quadro 5.** Número de partos por ano por cada número de bandas usadas.

<b>Bandas</b>	<b>Ritmo de produção (dias)</b>	<b>Intervalo entre partos (dias)</b>	<b>Frequência entre partos/em cada x dias</b>	<b>Partos por ano</b>
Semanais (6 bandas)	4	35	240/7	12480
Semanais (6 bandas)	11	42	200/7	10400
Semanais (6 bandas)	18	49	172/7	8944
Semanais (6 bandas)	25	56	150/7	7800
Quinzenal (3 bandas)	11	42	400/14	10400
Quinzenal (3 bandas)	25	56	300/14	7800
Trissemanal (2 bandas)	11	42	600/21	10400
Única (1 banda)	4	35	1200/35	12480
Única (1 banda)	11	42	1200/42	10440
Única (1 banda)	18	49	1200/49	8940
Única (1 banda)	25	56	1200/56	7800

**Fonte:** Adaptado de Fernandes (2009).

Partindo da base que todas as opções são possíveis, é necessário analisar cada situação para determinar qual é o melhor ritmo a seguir em função do equipamento de jaulas instalado, da disponibilidade de mão-de-obra, do menor investimento a fazer e, finalmente, da maior rentabilidade da sua implementação (Fernandes, 2009).

#### 4.2. Proporção entre machos e fêmeas

A proporção entre machos e fêmeas no núcleo reprodutor depende da dimensão da exploração, ritmo de reprodução utilizado e método de beneficiação (natural ou artificial) (Mourão e Pinheiro, 2004).

As explorações de maior dimensão, por terem um maior número de animais, podem utilizar uma relação macho/fêmeas menor, sem correrem os riscos de impossibilidade de substituição de um macho em caso de necessidade ou de aumentarem a consanguinidade na exploração. Em geral, as explorações intensivas com mais de 50 coelhas reprodutoras em monta natural utilizam um macho para 8 a 10 fêmeas (Quadro 6).

**Quadro 6.** Proporção entre machos e fêmeas com cobrição natural em função da dimensão da exploração.

Dimensão da exploração (nº de fêmeas)	Proporção macho/fêmeas
> 50	1:8 a 1:10
25 a 50	1:5 a 1:8
< 25	1:4 a 1:5

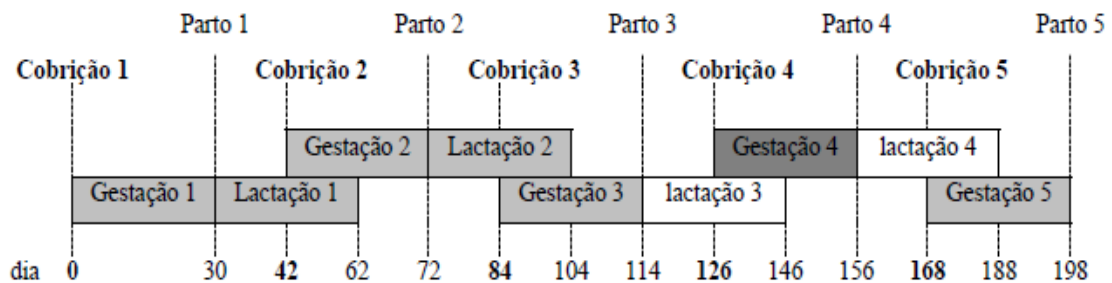
**Fonte:** Adaptado de Mourão e Pinheiro (2004).

Quando a exploração utiliza inseminação artificial com base no sémen dos seus machos, a relação macho/fêmeas pode ser reduzida para um macho para 80 a 100 fêmeas. Todavia, quando se concentram as beneficiações num único dia de 6 em 6 semanas, como ocorre no sistema de banda única, deve haver mais de um macho para 30 a 40 fêmeas (Mourão e Pinheiro, 2004).

### 4.3. Ritmo reprodutivo

O ritmo de reprodução semi-intensivo é o que mais se pratica nas explorações. Este prevê a beneficiação da coelha 10 a 20 dias após o parto, procurando aproveitar o aumento da receptividade da fêmea que se verifica neste período. As taxas de fertilidade obtidas com este ritmo situam-se entre 70 e 80% (Mourão e Pinheiro, 2004).

Com este sistema de produção, é possível, em teoria, obter um intervalo médio entre cobrições de 40 a 50 dias (Figura 11). Todavia, com uma taxa de fertilidade de 80%, este intervalo passa a um intervalo entre partos próximo de 50 dias, ou seja 7 partos por ano.



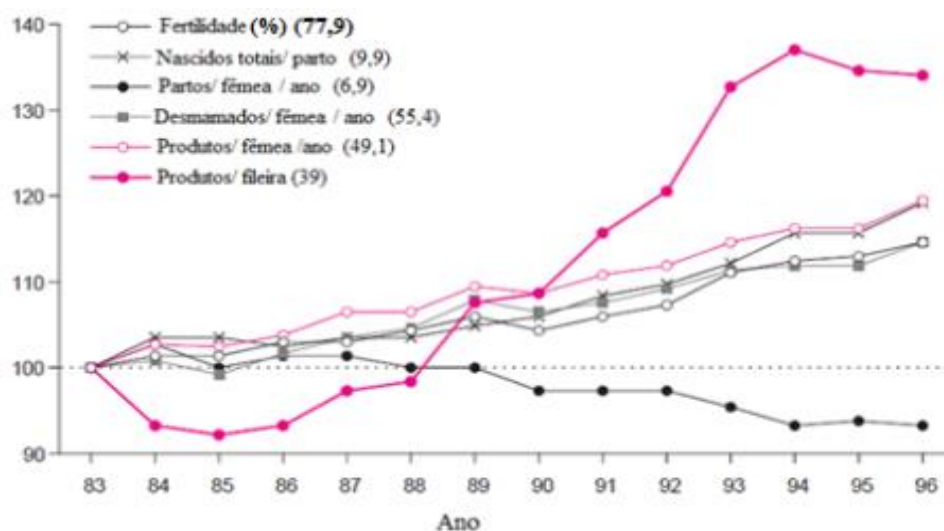
**Figura 11.** Ritmo de reprodução semi-intensivo com cobrição 12 dias após o parto e desmame aos 32 dias.

**Fonte:** Adaptado de Mourão e Pinheiro (2004).

Em condições ideais este ritmo de reprodução permitirá que cada fêmea produza cerca de 60 láparos nascidos e 51 láparos desmamados por ano. A utilização do ritmo de reprodução semi-intensivo obriga à realização do desmame precoce. Este realiza-se por volta dos 31 a 35 dias de idade, sendo que, estas idades de desmame permitem que a coelha não esteja em lactação na fase final da gestação, quando as necessidades são maiores. Como as coelhas submetidas ao ritmo de reprodução semi-intensivo estão em lactação e gestação, devem ser alimentadas *ad libitum*. Se esta prática for seguida, o crescimento dos fetos e o crescimento dos láparos em lactação não serão muito afetados (Mourão e Pinheiro, 2004).

Como inconvenientes deste programa de reprodução, quando comparado com a reprodução extensiva, é possível apontar a necessidade de realizar o desmame precoce, a diminuição do tamanho médio da ninhada e o desgaste fisiológico das coelhas por se encontrarem com frequência em gestação e/ou lactação (Mourão e Pinheiro, 2004).

No entanto, a produtividade das fêmeas tem aumentado devido ao uso de alguns genótipos e à melhoria do manejo e das condições de produção (Maertens, 2000). As fêmeas têm maior capacidade de produção leiteira, partos com maior número de láparos nascidos vivos e desmamados. Dados de Bolet *et al.* (1998) (Figura 12) também demonstram o aumento da produtividade nos finais do século passado, naturalmente também resultado das melhorias a todos os níveis das produções intensivas.



**Figura 12.** Evolução da produtividade na produção de coelhos entre 1983 e 1996.  
**Fonte:** Adaptado de Bolet *et al.* (1998).

## 5. FISILOGIA DA REPRODUÇÃO DE COELHOS

### 5.1. Características reprodutivas da coelha

A coelha apresenta 2 ovários pequenos em formato oval e dois úteros independentes (com comprimento ao redor de 7 cm) que se ligam à vagina por dois canais cervicais. Os primeiros folículos aparecem no 13º dia após o nascimento, e os primeiros folículos antrais surgem aos 65-70 dias. As coelhas tornam-se recetivas com 10-12 semanas de idade, mas geralmente ainda não são capazes de ovular. A idade à puberdade varia muito, de acordo com o genótipo: observa-se maior precocidade sexual nos genótipos pequenos ou médios (4-6 meses) do que nos genótipos pesados (5-8 meses). Nas explorações, procede-se à beneficiação das coelhas quando as mesmas atingem 80-85% do peso adulto para o seu genótipo (Mourão e Pinheiro, 2004).

## Fertilidade

A taxa de fertilidade de um efetivo é determinada pela relação entre o número de coelhas beneficiadas e o número de fêmeas paridas num determinado período de tempo (normalmente um ano). A capacidade de ficar gestante e parir láparos viáveis depende de diversos fatores, como a origem genética da coelha, o manejo durante a recia, condições ambientais, condição fisiológica da coelha e o ritmo de reprodução, entre outros.

Para que após a beneficiação ocorra o parto, é necessário que o aparelho genital da coelha esteja numa condição fisiológica adequada, permitindo que após a beneficiação se dê a progressão dos espermatozoides, a ovulação, a fecundação, a implantação embrionária e o desenvolvimento embrionário e fetal normais (Mourão e Pinheiro, 2004).

A taxa de fertilidade da coelha é dependente do intervalo entre o parto e a beneficiação, entre outros fatores (Quadro 7). Nas beneficiações efetuadas um ou dois dias pós-parto, embora a receptividade da coelha seja elevada, a fertilidade é baixa. Depois do 3º ou 4º dias de lactação, a fertilidade das beneficiações tende a aumentar progressivamente, acompanhando a evolução positiva da receptividade, atingindo valores elevados nas beneficiações realizadas 20 dias pós-parto. Deste modo a fertilidade é reduzida em 10 a 20% nas coelhas beneficiadas durante a lactação, sobretudo se é realizada nas primeiras semanas. Dado que na coelha aleitante os níveis de LH e de FSH diminuem quando o número de láparos em amamentação aumenta, será de esperar um aumento deste efeito negativo na ovulação e na fertilidade com o aumento do tamanho da ninhada (Mourão e Pinheiro, 2004).

**Quadro 7.** Percentagens de fêmeas férteis quando submetidas a ritmos de reprodução intensivo e semi-intensivo.

<b>Ritmo de reprodução</b>	<b>Fêmeas férteis (%)</b>
Intensivo	61,5
Semi-intensivo	71,1

**Fonte:** Adaptado de Mourão e Pinheiro (2004).



A prolificidade e a fertilidade da coelha degradam-se mais acentuadamente durante o período de reprodução, quando a coelha é utilizada de modo intensivo, estando sucessivamente em gestação e/ou lactação, devido ao elevado desgaste fisiológico. A fertilidade da coelha é influenciada ainda por outros fatores, como temperatura, luminosidade e alimentação. Estes são os três principais causadores do efeito sazonal. Devido aos efeitos combinados da temperatura e do fotoperíodo, a fertilidade das coelhas mostra-se dependente da estação do ano, sendo máxima na primavera e mínima no verão (devido às temperaturas elevadas associadas a fotoperíodos decrescentes) e no outono (devido ao fotoperíodo decrescente) (Mourão, 2003).

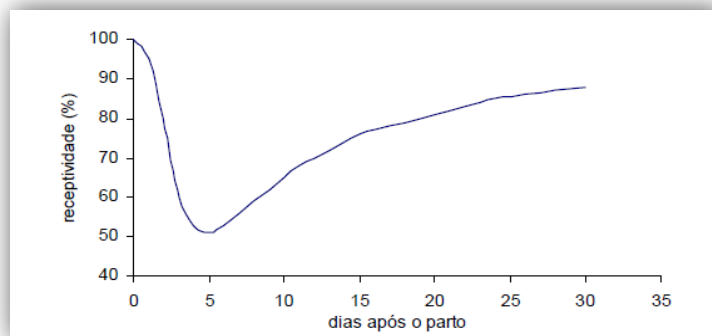
Outro fator importante que influencia a fertilidade é a recetividade da coelha ao macho. A recetividade num determinado efetivo pode ser quantificada pela relação entre o número de coelhas que aceitam o acasalamento e o número de coelhas apresentadas ao macho. Individualmente, ela pode ser avaliada pela coloração da vulva (um sinal externo de atividade estrogénica) no momento da beneficiação (Cailol *et al.*, 1983). A influência da recetividade na fertilidade após inseminação está apresentada no quadro 8.

**Quadro 8.** Influência da recetividade (medida pela coloração da vulva) na fertilidade à inseminação artificial.

<b>Coloração da vulva</b>	<b>Branca</b>	<b>Rosa</b>	<b>Vermelha</b>	<b>Violeta</b>
Fertilidade (%)	35	55	75	40

**Fonte:** Théau-Clement e Roustan (1991).

Durante a gestação a coelha produz uma quantidade elevada de progesterona e baixa de estrogénios, resultante da inexistência de folículos pré-ovulatórios no ovário, o que origina um estado de não recetividade. No fim da gestação, a produção de progesterona diminui, o que permite uma vaga de crescimento folicular que aumenta a produção de estrogénios. Estas alterações invertem na relação entre os níveis sanguíneos de estrogénios e de progesterona da coelha, o que origina o aparecimento de folículos pré-ovulatórios no momento do parto e elevada recetividade (próxima de 100%) (Mourão e Pinheiro, 2004) (Figura 13).



**Figura 13.** Evolução da taxa de receptividade da coelha no período de lactação.

**Fonte:** Adaptado de Mourão e Pinheiro (2004).

Por outro lado, no início da lactação a concentração sanguínea de prolactina aumenta para valores elevados, o que inibe a secreção e a ação das hormonas LH e FSH e, conseqüentemente, o crescimento folicular. Por esta via, dá-se uma redução do número de folículos pré-ovulatórios no ovário e da sua capacidade de produzir esteróides, pelo que níveis sanguíneos destes reduzem para valores inferiores aos valores observados no fim da gestação, provocando uma diminuição da receptividade da coelha, que atinge os valores mínimos (40-65%) no 3º a 4º dias de lactação. Depois da receptividade atingir o valor mínimo, inicia um aumento rápido até ao 12º a 15º dia de lactação, quando atinge níveis elevados (85-90%). Após esta fase, a receptividade aumenta lentamente ou mantém-se até ao desmame. A diminuição da receptividade no início da lactação é mais acentuada quando o número de láparos da ninhada é mais elevado (Mourão e Pinheiro, 2004).

A coelha não apresenta um ciclo éstrico com períodos regulares de estro, nos quais ocorre ovulação espontânea. Na coelha, a ovulação é induzida pela cópula (embora possa ocorrer ovulação espontânea – Morrell, 1995). A cópula induz um reflexo neuro-endócrino que provoca a libertação de um pico de hormona luteinizante (LH), que induz a ovulação (Bakker e Baum, 2000). A frequência dos pulsos de LH inicia-se 10 a 15 minutos após o estímulo sexual e mantém-se elevada por pelo menos 1 hora (Jones *et al.*, 1976). A ovulação ocorre 10-12 horas após o pico de LH. A hormona folículo estimulante (FSH) permanece exibindo pulsos frequentes, enquanto a LH retorna aos níveis basais 5-6 horas depois da cópula (Dufy-Barbe *et al.*, 1973).

Duas horas após a ovulação (natural ou induzida), ocorre um aumento da atividade muscular no istmo do oviduto (11,7-18,7 contrações/min durante o estro) que permanece desta forma por 2 a 3 dias. A implantação dos embriões ocorre 7 dias após a fecundação, no estágio de blastocisto. As concentrações de progesterona aumentam a partir do dia 3 até o dia 15 pós-cópula, permanecendo elevadas até próximo do parto (Bourdage e Halbert, 1980).

## **Prolificidade**

A prolificidade da coelha pode ser expressa pelo número médio de lárparos nascidos vivos por ninhada (não se consideram em geral os nados mortos). As coelhas híbridas utilizadas na produção intensiva têm uma prolificidade que se situa entre 7,8 e 10,5 lárparos por parto, mas com a maioria dos casos entre 8,7 e 9,4. Todavia, a prolificidade é uma característica dependente da taxa de ovulação e da viabilidade dos fetos e de diversos fatores de manejo e ambientais. Com frequência, os casos de não gestação após a beneficiação e de baixa prolificidade são devidos a condições desfavoráveis para a implantação do embrião e para o seu desenvolvimento posterior (Mourão e Pinheiro, 2004).

### **5.1.1. Seleção, manejo e sazonalidade reprodutiva nas coelhas**

A reprodutora deve ter 8 a 10 mamilos, boa capacidade de produção de leite e ser bem constituída, com uma pélvis larga e profunda de modo a facilitar o parto. Também é conveniente que as fêmeas não estejam demasiado gordas, dado que terão maiores dificuldades reprodutivas e menor fertilidade e prolificidade (Carvalho, 2009).

A sazonalidade produtiva do coelho deve-se principalmente, à variação da atividade reprodutiva destes animais, que pode ser influenciada pelo fotoperíodo. Na maior parte das explorações intensivas as coelhas estão alojadas em jaulas individuais em salas específicas com 16 horas de luz por dia (Bolet *et al.*, 1998). De facto, em pavilhões sem luz natural, recomenda-se o uso de 16 horas de luz por dia, efetuando a manipulação da sua duração como indutor da recetividade.

Urdiales (2005) indica que a utilização de 8 horas por dia de luz durante todo o ciclo, à exceção de um incremento a 16 horas uma semana antes da inseminação (*flushing* de luz), leva a resultados de fertilidade mais positivos que a manutenção constante de 16 horas por dia durante todo o ciclo. Também Gerencsér *et al.* (2008) verificaram o efeito positivo (sobretudo na fertilidade) da manipulação do fotoperíodo antes da inseminação de forma similar ao do estudo acima citado, tendo os autores proposto esta manipulação como alternativa ao uso de tratamentos hormonais, nomeadamente da eCG (*equine chorionic gonadotrophin*).

Para além da duração do fotoperíodo, é fundamental a intensidade luminosa aplicada. Segundo Silva (2002) deve-se utilizar no mínimo 4 watts/m<sup>2</sup> (20 lux/m<sup>2</sup>) nas maternidades, a fim de compensar as perdas que ocorrem com a sujidade cada vez maior das lâmpadas (embora estas devam ser limpas).

A temperatura ambiente e as condições ambientais gerais da exploração também interferem na produtividade, pois influenciam a condição sanitária, a taxa de mortalidade e o crescimento dos animais.

Durante o período de tempo em que as temperaturas são elevadas, o número total de nascidos vivos decresce significativamente, provavelmente devido ao aumento de mortes embrionárias antes da implantação (Silva, 2002) e aumenta o número de nascidos mortos. A mortalidade do nascimento ao desmame também aumenta, decrescendo assim o número de coelhos desmamados. Uma das justificações poderá ser a diminuição da produção de leite pelas fêmeas, resultado da redução da ingestão de alimento durante o período de *stress* térmico (Frangiadaki *et al.*, 2003). No estudo realizado por González-Redondo *et al.* (2008) observou-se a variação sazonal no número de coelhos desmamados, porém a prolificidade e o número de nascidos mortos não variou significativamente. Fayeye e Ayorinde (2008) indicam que a época do parto não influenciou significativamente o tamanho da ninhada, a percentagem de láparos nascidos vivos e o peso ao nascimento dos láparos. Todavia, a percentagem de sobrevivência registada por estes autores foi ligeiramente superior de outubro a março e as beneficiações efetuadas neste período resultaram também em taxas de conceção superiores.

Com temperaturas baixas assiste-se a um incremento do abandono de ninhos pelas reprodutoras, do consumo de alimento e a uma maior incidência de síndrome respiratório. Apesar de os coelhos possuírem mecanismos termorreguladores, os láparos recém-nascidos são incapazes de manter a sua temperatura corporal, dado que são desprovidos de pêlo e a ingestão de alimento depende da progenitora, impedindo-os de ajustar o consumo às suas necessidades. Deste modo, a fim de não incrementar a mortalidade nos ninhos, é fundamental manter a temperatura do ninho na ordem dos 30 a 35° C. A presença de outros láparos no ninho permite-lhes aglomerarem-se de forma a reduzirem as perdas de calor e assim manter a sua temperatura corporal (Silva, 2002).

## **5.2. Técnicas auxiliares de reprodução**

### **5.2.1. Métodos de indução da recetividade e da ovulação na coelha**

A utilização da inseminação artificial (IA) na cunicultura e a produção em bandas com o agrupamento das inseminações no tempo, criaram a necessidade de induzir e sincronizar a recetividade das coelhas. São assim necessários tratamentos das fêmeas com este objetivo, e assim determinar com exatidão o momento em que a fêmea está recetiva e de provocar um estado fisiológico favorável à indução da ovulação e ao desenvolvimento embrionário (Mourão e Pinheiro, 2004).

#### **5.2.1.1. Indução da recetividade**

A indução da recetividade pode ser obtida através de métodos hormonais, mais experimentados e generalizados, ou através de métodos de bioestimulação (Mourão e Pinheiro, 2004).

**Métodos hormonais:** A técnica mais divulgada de indução da recetividade com este fim é a administração de dose única de 15 a 25 UI da hormona eCG, 36 a 48 horas antes da IA. Devido ao seu efeito estimulador dos folículos, a eCG melhora a recetividade sexual e a prolificidade nas coelhas, mesmos das lactantes. A recetividade da coelha também pode ser conseguida com a utilização de prostaglandinas  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) ou dos seus análogos. Como é uma hormona que provoca a luteólise poderá ser utilizada

aquando duma palpação negativa, com o objetivo de reduzir o intervalo entre partos (Mourão e Pinheiro, 2004).

**Bioestimulação:** Para evitar os possíveis inconvenientes da utilização da eCG ou outras hormonas na indução da recetividade, estão a ser desenvolvidas técnicas alternativas, genericamente designadas por “bioestimulação”. Estas técnicas recorrem a mudanças do maneio da fêmea nos dias prévios à inseminação para provocar aumentos da recetividade sexual e da atividade ovárica (Mourão e Pinheiro, 2004).

Entre as técnicas que têm melhores resultados encontram-se:

- ✓ A separação da fêmea da sua ninhada durante 24 a 48 horas antes da beneficiação;
- ✓ A sobrealimentação (*flushing*) da coelha 4 a 5 dias antes da inseminação;
- ✓ Utilização de programas de luz com 8h de luz por dia até 8 dias antes da inseminação, seguido de 16 h de luz por dia ou programas equivalentes.

#### **5.2.1.2. Indução da ovulação**

A ovulação da coelha sujeita à IA pode ser induzida por estimulação mecânica ou estimulação hormonal.

Na estimulação hormonal pode-se recorrer a injeções de LH ou de hormonas análogas à LH como a hCG (*Human Corionic Gonadotrophin*) ou de hormonas de libertação das gonadotropinas (GnRH). A administração da LH é realizada 10 a 12 horas antes da IA. É eficaz na indução da ovulação e não provoca a produção de anticorpos pela coelha, o grande inconveniente é ser dispendiosa. A hCG permite obter taxas de ovulação próximas dos 100%, mesmo nas fêmeas aleitantes, mas a sua utilização repetida leva a um aumento do número das fêmeas que não ovulam devido à criação de anticorpos contra esta hormona. A GnRH ou produtos análogos como a Gonadorelina e a Buserelina, são eficazes e podem também ser utilizadas sem aparecerem reações imunológicas, com a vantagem de serem mais económicas. Assim, a prática mais realizada consiste na injeção por via intramuscular de 10 a 100 µg de GnRH no momento da inseminação, dependendo a quantidade da natureza dos distintos produtos comerciais (Mourão e Pinheiro, 2004).

### 5.2.2. Inseminação artificial

A aplicação da IA numa exploração cunícola, quando comparada com a reprodução natural, permite planificar melhor as operações de manejo, já que um elevado número de fêmeas é inseminado em simultâneo, reduz os custos de mão-de-obra e a disseminação de doenças associados à reprodução. A IA permite também reduzir o número de machos na exploração e conseqüentemente, possibilita uma maior seleção destes (Mourão e Pinheiro, 2004).

A realização da IA tem três vertentes principais: a recolha e avaliação do sémen, a preparação das doses e a inseminação propriamente dita (Mourão e Pinheiro, 2004).

O sémen pode utilizar-se fresco, refrigerado e congelado, sendo que, os resultados obtidos mediante IA com sémen fresco são de 60-80% de fertilidade, com uma prolificidade semelhante à de cobrição natural. No entanto, a IA em cunicultura encontra-se limitada pela baixa relação ejaculado/fêmeas inseminadas (1:10); e pelo tempo de refrigeração recomendado para o sémen (24h a 16-18° C) assim como pela tecnologia de congelação de sémen que, nesta espécie, não oferece resultados competitivos a nível de exploração, já que a motilidade e normalidade acrossómica pós-descongelação descem 50% (Vicente, 1998).

A técnica consiste na:

- ✓ Recolha do sémen do macho utilizando uma vagina artificial;
- ✓ Diluição do sémen (1:5 a 1:15);
- ✓ Inseminação (com sémen fresco) entre 1 a 4 horas após a recolha do sémen;
- ✓ No momento da inseminação, induzir-se a ovulação.

Na figura 14, está indicado o material utilizado na IA.



**Figura 14.** Equipamento utilizado na IA em cunicultura: **1**- Corpo da vagina artificial; **2** – Manga interna da vagina artificial; **3** - Coletor da vagina artificial; **4** - Coletor para sêmen diluído; **5** - Protetor térmico do coletor da vagina artificial; **6** – Termômetro; **7** - Cânula de inseminação curva; **8** - Seringa; **9** – Cânula de inseminação direita.

**Fonte:** Adaptado de Mourão e Pinheiro, 2004.

Após a recolha devem-se evitar choques mecânicos, térmicos e químicos do ejaculado. Depois da remoção da fração gelatinosa com uma pinça, o ejaculado deve ser introduzido o mais rapidamente possível num banho térmico com temperatura entre 25 e 36° C e analisado macroscópica e microscopicamente para a sua avaliação.

Na temperatura do banho térmico devem-se evitar variações bruscas ou oscilações da temperatura do sêmen, dado que quando o sêmen é utilizado refrigerado a sua temperatura final é de 17 a 19° C e que no inverno este arrefece mais rapidamente que no verão. No inverno a temperatura do banho térmico deve situar-se próximo dos 36° C e no verão próximo dos 25° C (Mourão e Pinheiro, 2004).

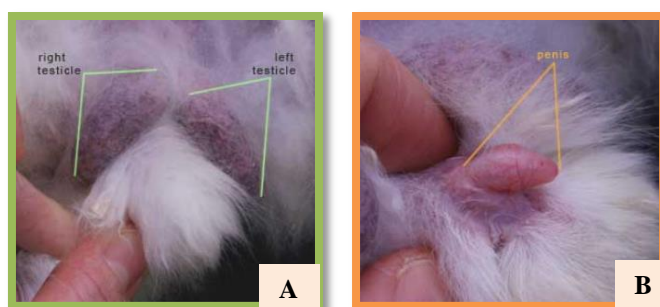
As avaliações específicas do sêmen do macho serão descritas mais adiante neste trabalho.

### **5.2.3. Características fisiológicas e reprodutivas do macho**

O coelho possui testículos em formato oval (Figura 15 - A) mantidos no interior do escroto. O pênis (Figura 15 - B) é curto e direcionado para trás, dirigindo-se para diante quando ereto. A descida dos testículos ocorre ao redor dos 2 meses de idade (Mourão e Pinheiro, 2004).

Tal como na fêmea, a puberdade e maturidade sexual dependem, entre outros, da genética do macho, nomeadamente do tamanho adulto (Mourão e Pinheiro, 2004).





**Figura 15.** Aparelho reprodutor do macho. **A** - Testículos (esquerdo e direito) e **B** - pênis do coelho.

**Fonte:** pet-informed-veterinary-advice-online.com.

No quadro 9 são apresentados alguns valores de características do sêmen de coelho de vários genótipos. Nos quadros 10 e 11 são apresentados valores específicos para os genótipos envolvidos no presente estudo.

**Quadro 9.** Parâmetros de avaliação do sêmen de coelho em vários estudos. Para cada parâmetro são apresentados os valores limite de modo a dar uma ideia do seu espectro.

<b>Fonte</b>	<b>VOL (mL)</b>	<b>MOT (%)</b>	<b>CONC (x10<sup>6</sup> SPZ/mL)</b>	<b>SPZ vivos (%)</b>	<b>SPZ normais (%)</b>
Nizza <i>et al.</i> (2003)	0,53 – 0,64	68 - 71	359 - 406	78 - 81	78 - 81
Rodriguez de Lara <i>et al.</i> (2008)	0,48 – 0,69	62 - 78	140 - 190	-	76 - 80
Castellini (2008)	-	70 - 79	353 - 493	-	-
Pascual <i>et al.</i> (2004)	0,6 – 1,1	-	84 - 417	-	86 - 96
Ain-Baziz <i>et al.</i> (2012)	0,7 – 0,9	-	-	-	81 - 85
Safaa <i>et al.</i> (2003)	0,4 – 0,8	52 - 69	551 - 762	81 - 88	83- 91
El-Masry <i>et al.</i> (1994)	0,7 – 0,8	41 - 56	156 - 211	83 - 85	85 - 86

VOL – volume do ejaculado; MOT – Motilidade dos espermatozoides; CONC – concentração espermática, SPZ – espermatozoides.

Relativamente ao quadro anterior, é importante referir que alguns dos fatores de variação para cada parâmetro (em cada estudo) foram o genótipo, a estação do ano, o manejo reprodutivo e a alimentação. Verifica-se uma elevada variabilidade, muita dela decorrente dos fatores de variação referidos, mas de uma forma geral, podemos dizer que o sêmen de coelho apresenta geralmente um volume entre 0,5 e 1,5mL, uma motilidade entre os 60 e os 80%, uma concentração entre os 100 e acima de 700 x 10<sup>6</sup> SPZ/mL. Estes dois últimos parâmetros referidos são, tal como reportado por Khalil *et al.* (2007) dos que apresentam maior variabilidade aquando da avaliação do sêmen. A

percentagem de SPZ vivos varia entre os 80 e os 90% e a percentagem de SPZ morfológicamente normais entre os 75 e os 95%.

**Quadro 10.** Características comportamentais do sémen do genótipo Valenciano.

Características	Média	Fonte
Tempo de reação (s)	10	Vicente e Viudes de Castro (1996)
Volume de ejaculado (mL)	0,9	“
Concentração espermatozóides - SPZ/mL ( $10^6$ )	340	“
Motilidade SPZ (%)	80	“
SPZ anormais (%)	1	“

**Quadro 11.** Características comportamentais e do sémen do genótipo Gigante Espanhol.

Características	Média	Fonte
	0,9	Lopéz e Sierra (1998)
Volume de ejaculado (mL)	0,78	Mocé <i>et al.</i> (2005)
	125	Lopéz e Sierra (1998)
Concentração espermatozóides - SPZ /mL ( $10^6$ )	137	Mocé <i>et al.</i> (2005)
	75	Lopéz e Sierra (1998)
Motilidade SPZ (%)	63	Mocé <i>et al.</i> (2005)
	17	Lopéz e Sierra (1998)
SPZ anormais (%)	23	Mocé <i>et al.</i> (2005)

#### **5.2.4. Avaliação e preparação do sémen do macho para a inseminação artificial**

##### **Avaliação macroscópica**

A avaliação macroscópica do sémen fresco, para a prática da IA, deve realizar-se imediatamente após a recolha. O sémen pode ser avaliado através do volume, da cor, da viscosidade e pela presença ou ausência da fração gelatinosa (Mourão e Pinheiro, 2004).

**Volume:** avaliado diretamente no tubo graduado coletor da vagina artificial (expresso normalmente em mL) (Mourão e Pinheiro, 2004).

**Cor:** O ejaculado deve ser branco (nacarado). Outras colorações estão em geral associadas a uma qualidade deficiente. Se a cor for amarelo esbranquiçado indica a presença de pus, se for amarelo-grisáceo indica a presença de urina. Quando contém sangue ou tecidos degenerados, o sémen adquire um tom rosado ou roxo claro e quando tem fezes um tom acastanhado. Quando se detetam estas cores anormais, o sémen não deve ser aproveitado para a IA (Mourão e Pinheiro, 2004).

**Viscosidade:** Quanto mais viscoso e opaco for o sémen tantos mais espermatozóides contém. À medida que se reduz a concentração em espermatozóides o aspeto fica mais aquoso (Mourão e Pinheiro, 2004).

**Presença da fração gelatinosa:** A presença desta substância, produzida pelas glândulas vesiculares, é comum. Em condições naturais esta secreção coagula na vagina impedindo o refluxo dos espermatozóides para o exterior. Na IA é prejudicial, porque exerce um efeito aglutinador dos espermatozóides, que perdem mobilidade. Por isso, é necessário separá-la do sémen antes de efetuar a sua avaliação (Mourão e Pinheiro, 2004).

### **Avaliação microscópica**

As observações mais comuns na avaliação microscópica do sémen são a motilidade, a percentagem de SPZ morfológicamente normais, a percentagem de SPZ vivos e mortos e a determinação da concentração espermática.

**Motilidade massal:** avaliada ao microscópio, numa gota de sémen não diluído sobre a lâmina, com temperatura a cerca de 38° C. Atribui-se uma pontuação numa escala de 0 a 5, em que 0 significa SPZ imóveis ou mortos e 5 com movimentos de massa muito rápidos.

**Motilidade:** avaliada ao microscópio, entre lâmina e lamela, numa gota do sémen diluído e com temperatura próxima de 38° C. É estimada a percentagem de SPZ móveis e pelo tipo de movimento que apresentam, que deve ser retilíneo e progressivo.

**Percentagem de espermatozóides morfológicamente normais:** avaliada ao microscópio com elevada ampliação ( $\geq 400 \text{ X}$ ) após a execução de um esfregaço do sémen diluído corado especificamente. Devem contar-se pelo menos 100 SPZ e, se possível qualificar e quantificar as morfo-anomalias. Um ejaculado só deve ser aceite para a IA quando o sémen contém mais de 70% de SPZ morfológicamente normais.

**Percentagem de espermatozóides vivos:** é estimada ao microscópio com ampliação média a alta (200 – 400 X). É feito um esfregaço com um corante vital (usualmente eosina ou eosina-nigrosina). Contam-se pelo menos 100 SPZ e determinam-se as percentagens de vivos (não corados).

**Determinação da concentração espermática:** realizada por contagem numa câmara adequada (Neubauer, Thomas, Burkner, ou outra) ou por espectrofotometria. Determina-se a quantidade de SPZ por unidade de volume. Normalmente expressa em SPZ  $\times 10^6/\text{mL}$  (Mourão e Pinheiro, 2004).

### **Diluição do sémen**

Um dos objetivos da IA é inseminar um elevado número de fêmeas utilizando um reduzido número de machos. A taxa de diluição do sémen depende do número mínimo de espermatozóides necessário por dose de IA, volume desta e da concentração de SPZ no esperma. Para a taxa de fertilidade máxima são necessárias doses de IA com pelo menos 10 milhões de SPZ e 0,5 mL de volume. Com um menor número de espermatozóides o tamanho da ninhada tende a diminuir. Em média com um ejaculado podem ser realizadas entre 10 a 20 doses (Mourão e Pinheiro, 2004).

### **5.3. Maneio dos machos reprodutores**

Durante o período de recria, o macho jovem deve ser alimentado *ad libitum* até ao início da sua vida reprodutiva, evitando-se contudo que engorde. Neste período a distribuição manual dos alimentos é vantajosa por permitir um melhor controlo individual (Mourão e Pinheiro, 2004).

Relativamente à atividade reprodutiva do coelho, os melhores resultados em termos de fertilidade e capacidade reprodutiva do coelho adulto são obtidos quando

realiza de 2 em 2 dias 2 cobrições sucessivas com um intervalo mínimo de 15 minutos. Caso se agrupem as cobrições num só dia da semana, o coelho pode realizar 3 cobrições nesse mesmo dia, com produção de ejaculado em quantidade e concentração suficientes para se obter a fecundação. Todavia, enquanto os machos forem jovens nos primeiros 3 meses de reprodução, o ritmo de utilização deve ser inferior (1 ou 2 cobrições por semana) (Mourão e Pinheiro, 2004).

O fim da vida produtiva do macho depende de diversos fatores, entre os quais a redução da sua fertilidade e da sua libido. Quando se utiliza a inseminação artificial, serão os parâmetros de valorização do sémen que indicam quando é que o macho deixa de ter interesse para a exploração (Mourão e Pinheiro, 2004).

### **5.3.1. Fatores que influenciam a eficiência reprodutiva do coelho**

#### **5.3.1.1. Alimentação**

A partir dos 5 a 6 meses de idade, início da atividade reprodutiva, a ingestão de alimento pelo coelho diminui naturalmente e este tem pouca tendência para engordar, sobretudo se for utilizado regularmente. Por este motivo, o coelho adulto deve ser alimentado *ad libitum*, especialmente se é jovem, dado que este nível de alimentação é o que geralmente permite obter melhores resultados na libido e na produção de esperma por ejaculado, embora não melhore a qualidade do sémen. A restrição da quantidade de alimento distribuído ao macho adulto degrada a libido e a produção de esperma por ejaculado, e quando é muito severa afeta negativamente a qualidade do sémen (Mourão, 2003). Também Luzi *et al.* (1986) (citados por Castellini, 2008) mostraram que a restrição alimentar reduz a libido e alguns parâmetros do sémen. Este último autor, na sua revisão, refere que mais importante que a quantidade de alimento fornecido são as suas características químicas e referencia algumas das necessidades em proteína bruta, ácidos gordos e vitaminas.

Todavia, durante o período de reprodução devem ser feitos controlos periódicos do peso do macho, sobretudo se provêm de linhas de elevado crescimento. O macho mais velho pode ser submetido a restrições moderadas para evitar peso corporal excessivo. Esta restrição tem como objetivo principal evitar que o coelho adquira problemas de membros em resultado de peso corporal muito elevado, sendo que o macho adulto que não apresenta libido deve ser eliminado (Mourão e Pinheiro, 2004).

### **5.3.1.2. Seleção e melhoramento**

Quando se pretende obter a melhor produtividade da exploração devem ser escolhidos reprodutores resultantes de programas de seleção. A utilização de animais não selecionados, mesmo que seja conhecido o seu genótipo, leva à deterioração dos resultados reprodutivos da exploração. É também essencial evitar utilizar os animais com fins diferentes dos que foram tidos em consideração na sua seleção. É conhecida a elevada variabilidade das características do sémen entre animais (Mocé *et al.*, 2005 citados por Castellini, 2008). Também entre tipos genéticos e comparando genótipos puros e cruzados foram reportadas diferenças nas características seminais e na fertilidade (Viudes *et al.*, 2004, Brun *et al.*, 2002 e 2004, citados por Castellini, 2008).

### **5.3.1.3. Conformação corporal**

O coelho reprodutor deve ter uma elevada proporção de carne de alta qualidade, pelo que é essencial possuir uma boa conformação corporal. Animais com malformações devem ser rejeitados. O macho deve ter o aparelho sexual externo bem desenvolvido, com 2 testículos sólidos e elásticos e caracteres sexuais secundários bem vincados (cabeça larga, constituição robusta, ossos fortes) (Mourão e Pinheiro, 2004).

### **5.3.1.4. Idade e ritmo de recolha do sémen**

O coelho submetido à IA não deve iniciar a sua atividade reprodutiva antes dos 5 a 6 meses de idade ou, mais um mês, se os machos forem de genótipos pesados. O seu treino deve iniciar-se cerca de um mês antes do início da recolha regular de sémen. No que respeita à estabilidade da cromatina nos SPZ, os melhores resultados são obtidos com animais entre os 6 e os 16 meses de idade (Castellini, 2008).

No que respeita à frequência, a colheita de dois ejaculados uma vez por semana (com um intervalo mínimo entre eles de 15 min) permite a melhor produção espermática quer quantitativa quer qualitativamente (Bencheikh, 1995 e Moce *et al.*, 2004, citados por Castellini, 2008). A colheita pouco frequente (cada 2 semanas) exerce um efeito negativo sobre o *output* de sémen, provavelmente devido à fraca estimulação sexual, seguida de redução dos androgénios (Castellini *et al.* 2006, citados por Castellini, 2008).

### **5.3.1.5. Sazonalidade e ambiente da exploração**

O coelho criado em condições naturais tem variações sazonais na produção espermática e no comportamento reprodutivo, com o pico da atividade de abril a junho e a atividade mais baixa no fim do outono (Mourão e Pinheiro, 2004).

Nas espécies com uma reprodução estacional de “dia longo”, como o coelho, a descida dos níveis de melatonina na primavera conduz ao incremento dos níveis de GnRH. Este aumento vai desencadear a nível hipofisário uma maior libertação de gonadotropinas, que estimulam a função testicular durante a primavera e o verão, atingindo o seu valor mais baixo no solstício de inverno (Boyd e Myhill, 1987 citados por Rodríguez de Lara *et al.*, 2008). A atividade espermática reflete-se no peso dos testículos que atingem o peso mais elevado no início do verão e o mais baixo no fim do outono (Mourão e Pinheiro, 2004). Estas variações sazonais estão principalmente relacionadas com o fotoperíodo e com a temperatura, mas ocorrem mesmo quando o macho é mantido sob fotoperíodo constante (12L: 12E).

Na cunicultura industrial é necessário manter a produção máxima durante todo o ano pelo que as explorações, nomeadamente no que respeita às suas instalações deverão permitir aos criadores a obtenção das condições ambientais que permitam, o mais possível, atenuar as variações sazonais de produtividade e a expressão produtiva máxima relativamente ao potencial genético dos reprodutores. A utilização de programas de luz, com fotoperíodo constante ao longo do ano, favorece a qualidade do sémen e a fertilidade do coelho adulto, reduzindo o impacto da estação do ano nestas características (Mourão e Pinheiro, 2004).

Segundo Ferré e Rosell (2000) a duração do fotoperíodo para reprodutores deverá ser de 12 a 16 horas. Em pavilhões com luz natural a sua duração é determinada pelas horas de luz de cada dia. Assim, nos dias em que o número de horas de luz seja insuficiente, deverá utilizar-se luz artificial.

Especificamente para o macho, estudos de Theau-Clément *et al.* (1994) (citados por Castellini, 2008) mostraram que um programa diário de luz constante de 16h de luz e 8 de obscuridade melhora os parâmetros quantitativos e qualitativos do sémen. Por outro lado, a intensidade da luminosidade parece não afetar significativamente as características do sémen (Besenfelder *et al.*, 2004, citados por Castellini, 2008).

Relativamente à temperatura, quando baixa o coelho recorre a uma maior produção de pêlo, um maior consumo de alimento e diminuição da superfície corporal a fim de diminuir a irradiação calorífica. Pelo contrário, na presença de calor excessivo, o coelho acelera os movimentos respiratórios e evapora água através da superfície pulmonar. Outro mecanismo é a vasodilatação cutânea, que permite a irradiação de calor através de um aumento da superfície de contacto do sangue com o ar ambiente. Apesar destes mecanismos, a eficácia em baixar a temperatura corporal é baixa, dado que o coelho não possui um sistema de transpiração eficaz (baixo número de glândulas sudoríparas). Deste modo se explica a ideia de que o coelho resiste melhor às temperaturas baixas do que ao calor (Carvalho, 2009).

As altas temperaturas associadas ao verão induzem uma diminuição da libido (tempo entre a introdução da coelha na jaula do macho e a ejaculação) quando comparada à primavera (Ain-Baziz *et al.*, 2012) ou ao inverno (Nizza *et al.*, 2003). Também conduzem à diminuição da quantidade e/ou qualidade do sémen e eventualmente a situações de esterilidade temporária dos machos ( $> 32^{\circ} \text{C}$ ) (Silva, 2002). Os efeitos do *stress* térmico sobre as características do sémen do coelho foram objeto de uma revisão por Marai *et al.* (2002) onde poderão ser encontrados resultados de vários estudos.

Centrando o foco nas principais características do sémen e suas variações sazonais apresentamos no quadro 12 alguns resultados em estudos onde a estação do ano foi um dos fatores de variação estudados.



**Quadro 12.** Volume, motilidade individual, concentração espermática, % de espermatozoides vivos e % de morfo-anomalias espermáticas em estudos que tiveram a estação do ano como fator de variação.

Fonte	Volume (mL)				Motilidade individual (%)				Concentração espermática (x 10 <sup>6</sup> SPZ/mL)				Espermatozoides vivos (%)				Espermatozoides anormais (%)			
	VE	OU	IN	PR	VE	OU	IN	PR	VE	OU	IN	PR	VE	OU	IN	PR	VE	OU	IN	PR
A	-	-	0,6	0,6	-	-	63,7	74,8	-	-	157,9	172,4	-	-	79,8	75,5	-	-	84,6	103,9
B	0,6*	-	0,55*	-	70,4	-	68,0	-	394,1*	-	360,5*	-	80,7	-	-	78,1	20,4	-	21,1	-
C	0,8	-	0,7	-	40,6	-	56,0	-	156,1*	-	210,5*	-	-	-	-	-	15,2	-	14,3	-
D	0,7*	-	-	0,9*	3,4*	-	-	3,6*	441,3*	-	-	621,8*	58,6*	-	-	80,0*	18,6*	-	-	15,1*

A - Rodríguez de Lara *et al.* (2008); B - Nizza *et al.* (2003); C - El-Masry *et al.* (1994); D - Ain-Baziz *et al.* (2012); VE – Verão; OU – Outono; IN – Inverno; PR – Primavera.

Os \* representam diferenças significativas (independentemente do nível de significância mas sempre para P <0,05) entre estações para o mesmo parâmetro.

Rodríguez de Lara *et al.* (2008) comparando o sémen recolhido no inverno e na primavera que não existiam diferenças no volume do ejaculado mas na primavera o sémen apresentava maior motilidade (75 vs 64%), maior concentração (172 vs 158 x 10<sup>6</sup> SPZ/mL) e, embora a percentagem de SPZ morfológicamente normais fosse mais baixa (76 vs 80%), o número total de SPZ normais e moveis progressivos era também significativamente superior (104 vs 85 x 10<sup>6</sup> SPZ/mL).

Nizza *et al.* (2003) verificaram que os ejaculados recolhidos no Inverno (comparados aos obtidos no Verão) apresentam menor volume e menor concentração, no entanto são similares os valores de motilidade, percentagem de SPZ vivos e anomalias espermáticas. El-Masry *et al.* (1994) comparando o efeito das mesmas estações, apenas verificaram uma significativa diminuição da concentração espermática no verão, estação onde o sémen apresentava também uma menor motilidade (embora de forma não significativa).

Num estudo no Brasil Scapinello *et al.* (1997) observaram uma diminuição da motilidade dos SPZ à medida que as colheitas eram realizadas nos meses mais quentes do ano. Também observaram uma diminuição da concentração espermática no mesmo sentido, embora de forma não significativa.

O efeito pernicioso do verão parece existir mesmo em animais supostamente mais adaptados a condições climáticas mais quentes. Num estudo com uma raça local argelina, Ain-Baziz *et al.* (2012) verificaram uma quebra no volume, motilidade, viabilidade e concentração e um aumento de morfo-anomalias espermáticas no verão quando comparado com os valores observados na primavera.

É ainda de salientar que os efeitos da temperatura elevada podem também ser observados no sémen recolhido dois meses após a ocorrência dessas temperaturas, devido à duração da espermatogénese que no coelho é de cerca de 42 dias (Lavara *et al.*, 2000). Assim, o decréscimo na produtividade é por vezes mais expressivo no outono, do que no verão, como consequência do decréscimo da qualidade do sémen.

Pode-se considerar que numa exploração comercial com uma alimentação de qualidade, combinada com uma iluminação controlada e um conforto térmico assegurado, os efeitos da sazonalidade são atenuados. Mas isso não significa que não ocorram variações da fertilidade ou prolificidade de um ano para outro, dado que existem muitos fatores que influenciam estes parâmetros (Carvalho, 2009).

Na sequência desta informação técnico-científica acerca da sazonalidade e de como ela pode influenciar de uma forma particular as características quantitativas e qualitativas do sêmen e, de uma forma mais abrangente a eficiência reprodutiva e, claro, a produtividade das cuniculturas, o presente estudo teve como objetivos:

- Estudar as características do sêmen de dois genótipos de produção de carne (Valenciana, VT e Gigante Espanhol, GE);

- Verificar as eventuais variações sazonais dos parâmetros dum espermograma durante um ano;

- Avaliar a performance reprodutiva da exploração e sua evolução ao longo de um ano.

### **III.PARTE EXPERIMENTAL**

#### **1. ENQUADRAMENTO GERAL DO AMBIENTE EXPERIMENTAL**

Os dados e amostras utilizados no presente trabalho foram recolhidos entre julho de 2012 e maio de 2013, numa exploração privada, a AI – Andalus Portugal, em Albergaria-a-Velha. As análises laboratoriais das amostras obtidas foram efetuadas na exploração. As análises laboratoriais das amostras decorreram no mesmo período de tempo. Por fim, o tratamento dos dados e a redação da presente tese decorreu entre setembro de 2012 e setembro de 2013.

#### **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

##### **2.1. Exploração**

A exploração AI – Andalus Portugal, situada em Albergaria-a-Velha, é uma empresa privada, que surgiu através de uma parceria feita com a AI-Andalus espanhola. Trabalham com a linha genética desenvolvida pela Universidade de Valencia, animais de alto rendimento para explorações de carne.

Atualmente, na exploração, estão a selecionar-se quatro genótipos maternos, cujo objetivo principal é a melhoria do tamanho da ninhada ao desmame. O genótipo paternal é continuamente selecionado pelo crescimento diário pós-desmame, para melhorar indiretamente o índice de conversão.

A exploração, para além de realizar de forma rotineira a inseminação artificial, comercializa reprodutores e presta todo o tipo de apoio técnico e de manejo necessário nas explorações que queiram começar a desenvolver a técnica de inseminação artificial.

A ventilação em todas as salas é feita com ventiladores, sendo que na sala dos machos é feita de forma contínua.

Em relação às horas de luz, na sala dos machos só se acende a luz nas horas em que é necessário fazer alguma operação de manejo na sala. As salas das fêmeas têm 16 horas de luz nas semanas antes e depois da IA e 8h de luz nos restantes períodos.

As figuras 16-A a 16-I visam ilustrar as instalações e equipamentos da exploração.

No exterior dos pavilhões/salas estão dois silos, com alimento composto adquirido a empresas da especialidade (Figura 16 – A).

A exploração tem um laboratório, equipado com todo o material utilizado para análise do sémen, preparação e análise das doses de sémen (Figura 16 – B, C e D) e todo o material respeitante às atividades laboratoriais inerentes à exploração.

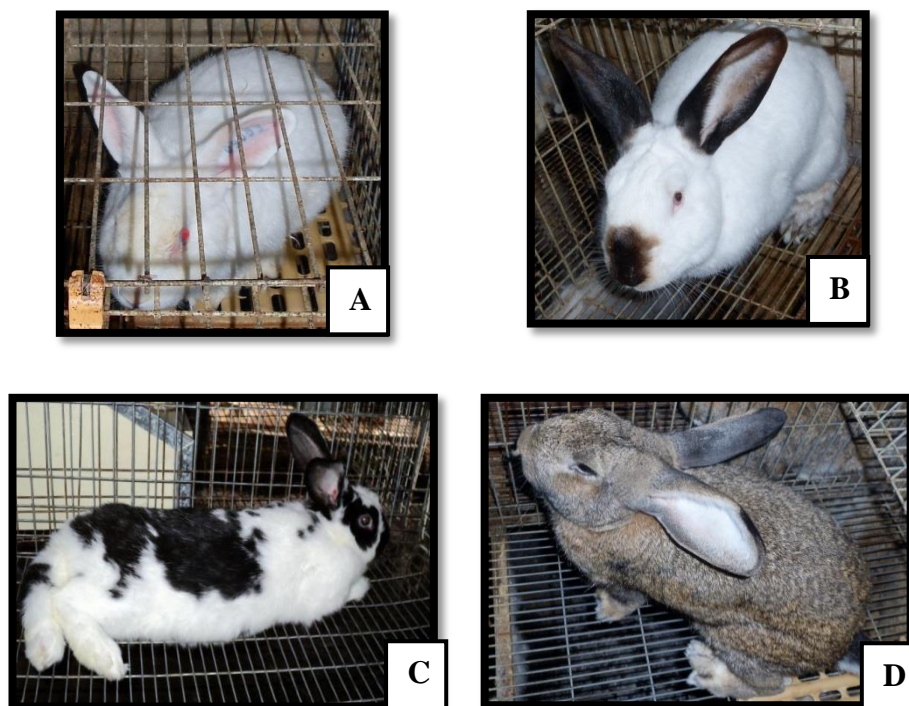
No total existem uma sala para os machos, duas salas para as fêmeas e uma sala para os coelhos de engorda (Figura 16 – F, G, H e I). Nas salas das fêmeas, as jaulas são polivalentes e estão dispostas em *flat deck*. As jaulas estão equipadas com bebedouros automáticos (Figura 16 – E) e um comedouro por jaula.



**Figura 16.** Caracterização do exterior e interior da exploração. **A** – silos; **B** e **C** – equipamento de laboratório; **D** – análise de sémen; **E** – bebedouro automático; **F** – sala dos machos; **G** e **H** – salas das fêmeas; **I** – sala de engorda.

## 2.2. Animais

Aquando do início do presente estudo, na exploração haviam 153 machos. Deste total correspondiam: 18 *Grands-Parents* (GP), 97 Valenciano (VT), 16 Mariposa (M) e 22 Gigante Espanhol (GE) (Figura 17 – A, B, C e D). Todo o efetivo foi mantido nas mesmas condições de manejo alimentar, profilático e reprodutivo.



**Figura 17.** Genótipos da exploração. **A** – *Grands-Parents*; **B** - Valenciano; **C** – Mariposa e **D** – Gigante Espanhol.

Para o presente estudo foram escolhidos 22 machos VT e 22 machos GE (Quadro 13). Foram selecionados machos jovens (com menos de um ano) para ter uma amostra mais homogênea e tentar maximizar o número de animais até ao fim do ensaio, atendendo à vida útil relativamente curta dos machos reprodutores desta espécie.

**Quadro 13.** Número de coelhos e respetivos genótipos de acordo com o local de ensaio.

Animais	Genótipos			
	Experimental		Outros	
Coelhos	Valenciano (n=22 VT)	Gigante espanhol (n=22 GE)	<i>Grands-Parents</i> (n=18 GP)	Mariposa (n=16 M)

### 2.3. Recolha e avaliação laboratorial do sémen

Na exploração, as recolhas de sémen são realizadas por rotina cerca de 2 vezes por semana a cada macho. Os ejaculados avaliados no presente estudo são parte dos ejaculados recolhidos a cada macho, atendendo a que seria necessário ter amostras recolhidas ao longo de todo o ano para uma melhor avaliação da influência da estação do ano nas características do sémen. No total foram recolhidos 670 ejaculados, 350 de machos VT e 320 de machos GE. Por questões relacionadas com o manejo e organização da exploração não nos foi permitido analisar cada ejaculado individualmente mas sim uma “pool” dos ejaculados recolhidos em cada dia e para cada tipo genético. No total foram analisados laboratorialmente 40 “pools” de ejaculados de cada genótipo.

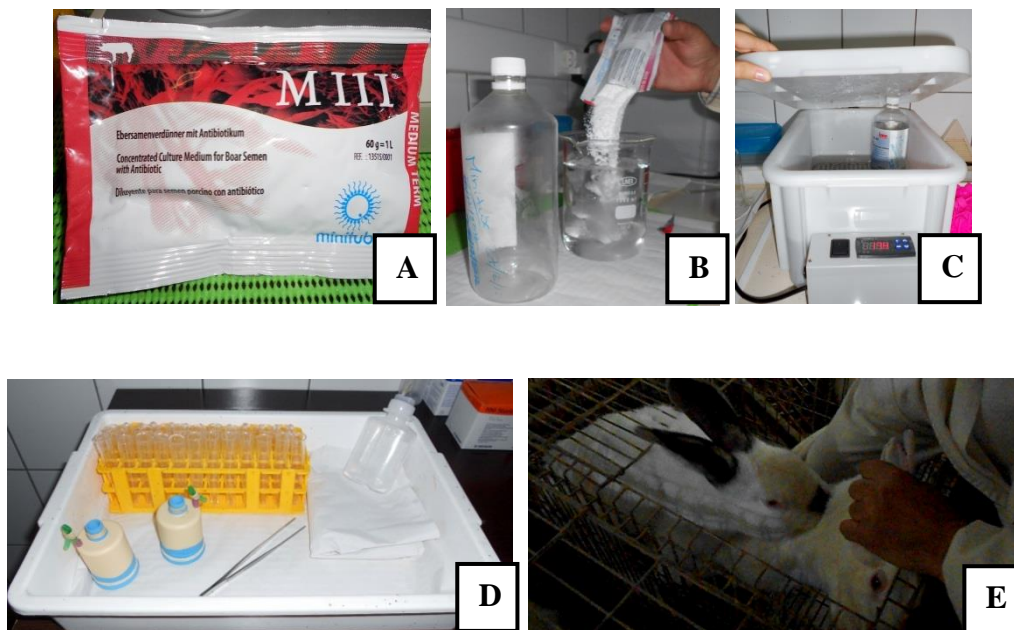
As visitas à exploração eram feitas de 2 em 2 semanas de cada mês, sendo que no mês de agosto de 2012 foram feitas 3 colheitas e no mês de dezembro do mesmo ano apenas uma.

No período anterior às colheitas do sémen, procedia-se à assepsia de todo o material de recolha e processamento do sémen e à preparação do diluidor (a elaborar cerca de 2h antes das colheitas). O diluidor utilizado era o *M III* (Figura 18 – A, B), um diluidor desenvolvido para o sémen de suíno que é utilizado por ter menor custo que o específico para coelho, sem quebra de resultados (responsável da exploração - comunicação pessoal, 2012). Diluía-se o conteúdo de uma saqueta de *M III* num litro de soro fisiológico previamente aquecido. Após homogeneização da solução, o diluidor era colocado num banho-maria regulado para uma temperatura entre os 36°C e 38°C (Figura 18 - C).

De seguida preparavam-se as vaginas artificiais (VA) e o tabuleiro com o restante material de recolha (Figura 18 – D).

As VA são compostas por um corpo rígido e por uma manga, colocada no seu interior. Na extremidade, tem uma válvula de borracha através da qual se coloca a água aquecida (entre 40 a 45° C) e se regula a pressão, antes da recolha do sémen. A água permanece entre o corpo rígido de borracha e a manga da VA. Para mimetizar uma cópula era utilizada uma coelha em cio, que servia de manequim vivo, e quando o macho saltava, o pénis do animal era desviado na direção da VA, fazendo a sua intromissão nesta.





**Figura 18.** Recolha e avaliação laboratorial do sémen. **A** – saqueta de diluidor; **B** – preparação do diluidor; **C** – diluidor em banho-Maria; **D** – tabuleiro com material de recolha; **E** – recolha de sémen.

Os ejaculados eram recolhidos individualmente e de forma sequencial, na jaula do macho (Figura 18 – E). De imediato retirava-se a fração gelatinosa com uma pinça e rejeitavam-se os ejaculados com cor anormal. Após esta breve análise macroscópica, juntaram-se todos os ejaculados recolhidos num tubo graduado, ficando-se assim com uma “pool” dos ejaculados. O volume total foi avaliado por observação direta em tubos graduados e registado em mL.

O sémen era então levado para o laboratório para análise e processamento. Era feita uma primeira diluição de 1:10 e separada uma porção ( $\approx 3$  mL) para análise, sendo esta guardada numa estufa entre 36 a 38° C. O restante sémen era refrigerado para posterior preparação das doses de inseminação.

#### 2.4. Análises macroscópica e microscópica das amostras

A avaliação macroscópica do sémen incluiu a avaliação da cor, presença de fração gelatinosa, presença de sedimentos e o volume total.

De forma sucinta, as metodologias de análise para os parâmetros macroscópicos considerados para avaliação foram:

a) Cor: determinada pela observação da “pool” dos ejaculados recolhidos. Quantificada numa escala de 0 a 3, em que 3 significa um ejaculado de cor normal e valores inferiores eram pontuados quando havia gradientes de anormalidade;

b) Presença de fração gelatinosa: determinada pela observação individual de cada ejaculado, num total de 44 ejaculados. Quantificada segundo uma escala de 0 a 5, em que:

0 - < 10 ejaculados com presença de fração gelatinosa

3 - 10 a 19 “

5 -  $\geq$  20 “

*Nota*: quando se observava a presença da fração gelatinosa no ejaculado, esta era retirado de imediato, com o auxílio de uma pinça, pela sua presença ser prejudicial na IA.

c) Presença de sedimentos: determinada pela observação da “pool” dos ejaculados recolhidos. Quantificada numa escala de 0 a 1, em que 0 significa ausência de sedimentos.

d) Volume total: determinada pela observação da “pool” dos ejaculados recolhidos. Avaliado por observação direta em tubos graduados e registado em mL.

*Nota*: ejaculados com presença de urina eram imediatamente rejeitados.

Os parâmetros microscópicos considerados para avaliação espermática foram:

a) a motilidade massal (numa escala de 0 a 5, representando o zero uma situação de necrospermia);

b) o grau de aglutinação (numa escala de 0 a 3, representando o valor de zero a ausência de aglutinação);

c) a determinação da percentagem de SPZ vivos e mortos;

d) a determinação da percentagem de SPZ normais;

e) a concentração espermática;

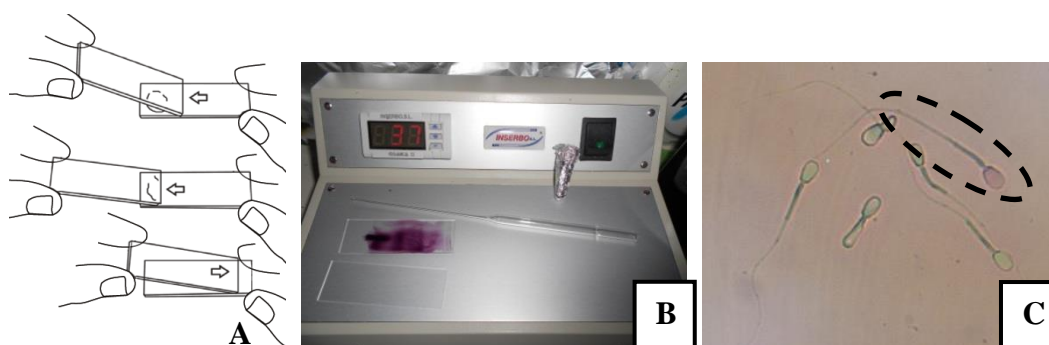
f) o número total de espermatozóides do ejaculado (resultado do produto entre o volume e a concentração espermática).

De seguida descrevemos de forma sucinta as metodologias de análise microscópica:

a) Motilidade massal: determinada colocando uma gota de sémen sobre uma lâmina (previamente aquecida) e avaliada ao microscópio a baixa ampliação (100X) (ver ANEXO 1);

b) Aglutinação: determinada colocando uma gota de sémen sobre uma lâmina (previamente aquecida) e avaliada ao microscópio a média ampliação (400X) (ver ANEXO 1);

Determinação da percentagem de SPZ vivos e mortos: determinada pela observação de um esfregaço de sémen (diluído) e corado com eosina-nigrosina (Figura 19 – A e B). A observação foi realizada em microscopia de campo claro, a média ampliação (400X). Os espermatozóides com membrana plasmática lesada apresentavam o núcleo corado de rosa (Figura 19 – C) e foram classificados como mortos. Células coradas pela eosina apenas na região pós-acrossomal foram igualmente consideradas mortas. As células vivas, portanto, com membrana plasmática íntegra, não se coraram e sua visualização foi possível pelo contraste dado pela nigrosina (Zúccari *et al.*, 2008; Brito, 2007; Brito *et al.*, 2003). Estas eram contabilizadas um total de 100 SPZ.



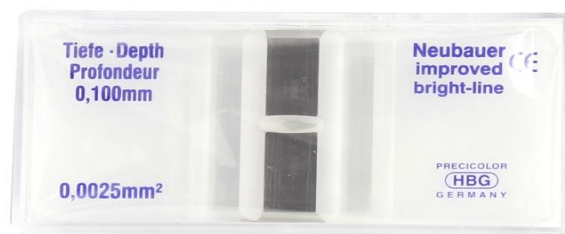
**Figura 19.** Morfologia e anomalias espermáticas.

**Fonte:** A - [www.educacaopublica.rj.gov.br](http://www.educacaopublica.rj.gov.br); C - [www.cvsanfernando.com](http://www.cvsanfernando.com)

c) Morfologia espermática: as anomalias morfológicas da cauda, da cabeça e peça intermédia, foram também determinadas pela observação do esfregaço corado com eosina-nigrosina. Contabilizavam-se 100 SPZ vivos ou mortos e as anomalias da amostra eram registadas (ver ANEXO II);

d) Concentração espermática: realizada por contagem de SPZ numa câmara de *Neubauer* (Figura 20). O sémen era diluído numa proporção de 1:30 para o genótipo VT e a 1:45 para o genótipo GE, numa solução com formol. Após a colocação do sémen diluído na câmara, e após um período de cerca de 2 min para estabilização,

eram contados os SPZ de 5 quadrados médios (que correspondem a um volume de  $0,02 \text{ mm}^3$ ) de cada uma das câmaras do dispositivo (ver ANEXO III). Seguidamente, efetuavam-se os cálculos relativos às unidades e fator de diluição utilizado, sendo o resultado final a média das 2 câmaras observadas.



**Figura 20.** Câmara de *Neubauer*.

**Fonte:** [www.selfpediatico.it](http://www.selfpediatico.it)

## 2.5. Tratamento dos dados e análise estatística

Todos os dados foram analisados com a utilização do *Software* estatístico *IBM SPSS Statistics*, versão 21.0. Foram realizadas análises de estatística descritiva global e por genótipo para os parâmetros macroscópicos e microscópicos dos ejaculados.

O volume e os parâmetros microscópicos dos ejaculados foram ainda analisados pelo procedimento das medições repetidas (“repeated measures”) com o genótipo como factor “between-subjects”. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Bonferroni.

As correlações entre parâmetros e respectivas significâncias foram obtidas usando o procedimento “correlate” do software. Consideraram-se os coeficientes de correlação de *Pearson* para o caso de distribuição normal dos valores ou *Spearman’s* no caso de distribuição não normal.

As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ . Todos os valores apresentados correspondem a médias dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão da média (*least-square means  $\pm$  standard error of mean*).

### 3. RESULTADOS

Como referido no capítulo anterior, as amostras de sémen estudadas não foram ejaculados individuais de cada macho mas sim uma “pool” de sémen resultante da mistura dos ejaculados de cada tipo genético colhido nos animais experimentais, nesse dia. Feita esta ressalva, iremos doravante designar essas “pools” de sémen por ejaculado.

No total, foram analisados para cada genótipo estudado, 10 ejaculados recolhidos no verão, 10 no outono, 10 no inverno e 10 na primavera.

Desde o início até ao final do estudo, dos 44 animais experimentais, morreram 5 machos VT e 6 machos GE. As mortes ocorreram de forma gradual (não sucederam especialmente em nenhuma estação do ano) e não tiveram uma explicação evidente.

No quadro 14 apresentamos os números, por genótipo, de falhas aquando da colheita do sémen, saltos em que o animal não ejaculava, não realização de saltos (quase sempre devido à existência de lesões nos membros posteriores) e ejaculados rejeitados (por presença de urina no sémen).

**Quadro 14.** Não realização de saltos, saltos sem ejaculação e ejaculados rejeitados, expresso em número de animais, para cada genótipo.

	<b>Não realização de saltos</b>	<b>Saltos sem ejaculado</b>	<b>Ejaculados rejeitados</b>
VT	12	0	8
GE	20	8	1

Apenas se verificaram saltos sem ejaculação no genótipo GE, tendo a maioria (> 60%) ocorrido no verão. A não realização de saltos nos animais VT foi essencialmente observada (75%) no outono. Já nos machos GE este tipo de falhas esteve uniformemente distribuído ao longo das diferentes estações. Os ejaculados rejeitados foram muito superiores nos animais VT, não apresentando, no entanto, qualquer tendência para ocorrerem numa determinada estação.

Nos quadros 15 e 16 apresentam-se alguns dos valores de estatística descritiva para os parâmetros macroscópicos e microscópicos dos ejaculados dos dois genótipos em conjunto. Relativamente à morfologia espermática, apresenta-se apenas a percentagem de SPZ morfologicamente normais.

**Quadro 15.** Estatística descritiva dos parâmetros macroscópicos.

<b>Parâmetro</b>	<b>n</b>	<b>MÍNIMO</b>	<b>MÁXIMO</b>	<b>MÉDIA</b>
Cor	44	3,0	3,0	3,0
Gel	44	0,0	4,5	0,8
SED	44	0,0	1	0,1
VOL MED	44	0,4	1,0	0,7

SED – sedimentos; VOL MED – volume médio (mL)

**Quadro 16.** Estatística descritiva da totalidade dos parâmetros microscópicos.

<b>Parâmetro</b>	<b>n</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>MEDIA</b>
MOTM	44	3,0	5,0	4,7
AG	44	0,0	2,0	0,2
SPZ V	44	78	98	91
SPZ N	44	73	98	86
CONC	44	57	242	120
NTSPZ	44	32	139	83

MOTM – motilidade massal; AG – aglutinação; SPZ – espermatozoides; SPZ V – SPZ vivos (%); SPZ N – SPZ morfologicamente normais (%); CONC - concentração espermática média ( $\times 10^6$  SPZ/mL); NTSPZ – número total de SPZ ( $\times 10^6$  espermatozoides/mL).

Nos quadros 17 e 18 apresentam-se alguns dos valores de estatística descritiva para parâmetros macroscópicos e microscópicos dos ejaculados de cada genótipo, separadamente.

**Quadro 17.** Estatística descritiva de parâmetros dos ejaculados dos machos Valenciano (VT).

<b>Parâmetro</b>	<b>n</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>MEDIA</b>
VOL MED	22	0,5	1,0	0,7
MOTM	22	3,0	5,0	4,8
AG	22	0,0	1,0	0,2
SPZ V	22	78	97	91,5
SPZ N	22	73	94	85,5
CONC	22	57	130	96
NTSPZ	22	32	112	69

VOL MED – volume médio (mL); MOTM – motilidade massal; AG – aglutinação; SPZ – espermatozoides; SPZ V – SPZ vivos (%); SPZ N – SPZ morfológicamente normais (%); CONC - concentração espermática média ( $\times 10^6$  SPZ/mL); NTSPZ – número total de SPZ.

**Quadro 18.** Estatística descritiva de parâmetros dos ejaculados dos machos Gigante Espanhol (GE).

<b>Parâmetro</b>	<b>n</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>MEDIA</b>
VOL MED	22	0,4	1,0	0,7
MOTM	22	4,0	5,0	4,6
AG	22	0,0	2,0	0,3
SPZ V	22	85	98	89,8
SPZ N	22	74	98	86,4
CONC	22	118	242	144
NTSPZ	22	52	139	96

VOL MED – volume médio (mL); MOTM – motilidade massal; SPZ – espermatozoides; SPZ V – SPZ vivos (%); SPZ N – SPZ morfológicamente normais (%); CONC - concentração espermática média ( $\times 10^6$  SPZ/mL); NTSPA – número total de SPZ ( $\times 10^6$  espermatozoides/mL).

No quadro 19 apresentam-se os resultados de parâmetros da avaliação espermática, de acordo com o genótipo e a estação do ano.

Os parâmetros da cor, gel (fração gelatinosa) e sedimentos não foram alvo de avaliação no quadro abaixo, pois para o caso da cor, este parâmetro servia *a priori* para detetar anomalias nos ejaculados. Em relação à fração gelatinosa e aos sedimentos, eram removidos na preparação das doses para a IA.



**Quadro 19.** Parâmetros da avaliação espermática de acordo com o genótipo e a estação do ano.

	Estação					Efeitos (valores de P)		
	GEN	VERÃO	OUTONO	INVERNO	PRIMAVERA	GEN	EST	GEN*EST
<b>VOL MED</b>	VT	0,73±0,05	0,77±0,05	0,72±0,05	0,64±0,05	0,17	0,08	0,08
	GE	0,52±0,05	0,70±0,05	0,77±0,05	0,67±0,05			
<b>MOTM</b>	VT	4,3±0,24	4,9±0,16	4,7±0,2	5,0±0,13	0,42	0,10	0,11
	GE	4,5±0,24	4,7±0,16	4,7±0,2	4,4±0,13			
<b>AG</b>	VT	0,2±0,2	0,2±0,14	0,2±0,22	0,0±0,28	0,37	0,76	0,31
	GE	0,2±0,2	0,0±0,14	0,4±0,22	0,6±0,28			
<b>SPZ V</b>	VT	86,2±1,63 <sup>a</sup>	94,4±1,83 <sup>b</sup>	91,2±1,83 <sup>ab</sup>	93,2±0,77 <sup>b</sup>	0,23	0,02	0,10
	GE	87,4±1,63	92,2±1,83	91,6±1,83	87,2±0,77			
<b>SPZ N</b>	VT	77±1,6 <sup>a</sup>	84,8±3,3 <sup>ab</sup>	88,6±2,6 <sup>ab</sup>	90,4±1,1 <sup>b</sup>	0,24	0,003	0,49
	GE	79,8±1,6 <sup>a</sup>	88,6±3,3 <sup>ab</sup>	88,8±2,4 <sup>ab</sup>	88,8±1,1 <sup>b</sup>			
<b>CONC</b>	VT	98±1,7 <sup>A</sup>	89±6,5 <sup>A</sup>	107±7,1 <sup>A</sup>	88±10 <sup>A</sup>	<0,001	0,41	0,70
	GE	150±1,7 <sup>B</sup>	130±6,5 <sup>B</sup>	148±7,1 <sup>B</sup>	151±10 <sup>B</sup>			
<b>NTSPZ</b>	VT	71,7±10	70,5±9,1	77,3±8 <sup>A</sup>	57,9±10 <sup>A</sup>	0,004	0,17	0,25
	GE	78,1±10	91,3±9,1	115±8 <sup>B</sup>	100±8 <sup>B</sup>			

VOL MED – volume médio (mL), MOTM – motilidade massal; SPZ – espermatozoides; SPZ V – SPZ vivos (%); SPZ N – SPZ morfologicamente normais (%); CONC - concentração espermática média (x10<sup>6</sup> SPZ/mL); NTSPZ – número total de SPZ (x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL); GEN – genótipo; EST – estação do ano. Letras minúsculas diferentes na mesma linha e letras maiúsculas na mesma coluna representam diferenças significativas.

Da análise do quadro 19 salientamos a influência significativa da estação do ano nos parâmetros percentagem de SPZ vivos e percentagem de SPZ morfológicamente normais. Esta influência sazonal não teve no entanto significância em ambos os genótipos, havendo casos em que ela existia apenas no genótipo VT.

Embora dependendo do genótipo considerado e não observando diferenças estatisticamente significativas entre as várias estações, verificamos que num dos genótipos (GE) os ejaculados obtidos no verão tendem a ser menos volumosos, e genericamente, os ejaculados obtidos no verão tendem a ter menor motilidade massal, menor percentagem de SPZ vivos e menor percentagem de SPZ morfológicamente normais.

O genótipo teve influência significativa na concentração espermática e no número total de SPZ. Relativamente à concentração, salientamos uma superioridade do genótipo GE em todas as estações do ano.

No quadro 20 apresentamos os coeficientes de correlação entre os principais parâmetros do sémen analisados (dois genótipos em conjunto).

**Quadro 20.** Coeficientes de correlação entre parâmetros do sémen.

	<b>MOTM</b>	<b>AG</b>	<b>CONC</b>	<b>SPZV</b>	<b>SPZN</b>	<b>NTSPZ</b>
<b>VOL MED</b>	0,001	0,061	-0,069	0,192	0,217	0,569***
<b>MOTM</b>	-	-0,195	-0,112	0,839***	0,475**	-0,053
<b>AG</b>	-	-	0,179	-0,157	-0,044	-0,085
<b>CONC</b>	-	-	-	-0,104	0,075	0,767***
<b>SPZV</b>	-	-	-	-	0,601**	0,052
<b>SPZN</b>	-	-	-	-	-	0,244

VOL MED – volume médio (mL); MOTM – motilidade massal; AG – aglutinação; CONC - concentração espermática média ( $\times 10^6$  SPZ/mL); SPZ – espermatozoides; SPZ V – SPZ vivos (%); SPZ N – SPZ morfológicamente normais (%); NTSPZ – número total de SPZ ( $\times 10^6$  espermatozoides/mL);

\*\*p <0,01; \*\*\*p<0,001

Da análise do quadro 20 salienta-se a existência de correlações positivas e significativas entre os parâmetros qualitativos do sémen, nomeadamente da motilidade, percentagem de SPZ vivos, percentagem de SPZ morfológicamente normais. A correlação entre o volume e a concentração, embora negativa, não atinge a significância estatística. Como esperado, há uma correlação positiva e significativa entre o número

total de espermatozoides e o volume do ejaculado por um lado, e a concentração espermática, por outro.

Pese embora, pelas circunstâncias em que as avaliações do sémen foram efetuadas, em ambiente produtivo comercial, não tenha sido possível obter dados reprodutivos específicos resultantes da utilização dos ejaculados analisados, estes foram parte do sémen utilizado nas inseminações artificiais realizadas na exploração durante o período de ensaios. Parece-nos portanto que a apresentação e discussão dos resultados reprodutivos da exploração, embora condicionada pela conjuntura acima referida, são de interesse técnico e científico.

No quadro 21 são apresentados os resultados reprodutivos das coelhas dos génotipos em estudo no presente trabalho durante o período de estudos.

**Quadro 21.** Resultados reprodutivos das coelhas dos genótipos VT e GE, durante o período de estudos.

Data I.A.	N° fêmeas I.A. (total)	Partos (%)	Nascidos			Média NV/parto	N° desmamados	Mortalidade nascimento(%)	Mortalidade desmame(%)	N partos	Ntotais/ parto	Desmam/ parto
			Vivos	Mortos	Totais							
3-Ago-12	700	76	4749	506	5255	8,9	3824	10,7	19,5	532	9,88	7,19
14-Set-12	717	80	5116	612	5728	9	4305	12	15,9	574	9,98	7,5
26-Out-12	725	79	5211	810	6021	9,1	4261	15,5	18,2	573	10,5	7,44
7-Dez-12	726	82	5249	824	6073	8,8	4281	15,7	18,4	595	10,2	7,19
18-Jan-13	715	79	5377	863	6240	9,5	4371	16	18,7	565	11,0	7,74
1-Mar-13	676	86	4717	815	5532	8,2	3613	17,2	23,4	581	9,52	6,22
12-Abr-13	673	83	4698	749	5447	8,4	3876	15,9	18	559	9,74	6,93
24-Mai-13	685	80	4518	709	5227	8,2	3522	15,7	22	548	9,54	6,43
5-Jul-13	685	79	4181	431	4612	7,8	3655	10,3	13	538	8,57	6,79
<b>Média</b>	<b>700</b>	<b>80</b>	<b>4868</b>	<b>702</b>	<b>5571</b>	<b>8,7</b>	<b>3968</b>	<b>14</b>	<b>19</b>	<b>563</b>	<b>10</b>	<b>7</b>

#### 4. DISCUSSÃO

Para a discussão dos resultados do presente estudo parece-nos importante realçar as circunstâncias em que o mesmo foi realizado, nomeadamente o facto de ter sido conduzido em ambiente de exploração intensiva privada e comercial. Tal facto permite ter registos sobre os animais e, neste caso, do sémen, mais “reais” do que os observados em condições experimentais, ou seja traduzem melhor a realidade da produção. Todavia, pela necessidade da realização rápida e eficiente das atividades normais de manejo da exploração, ficámos impossibilitados de executar algumas das avaliações de uma forma mais específica (avaliações por ejaculado e por animal), o que limita, pelo menos parcialmente, a interpretação dos resultados observados.

Também nos parece importante realçar a relativa escassez, sobretudo quando comparada com outras espécies de interesse zootécnico, de informação técnica e científica sobre a reprodução de coelhos e particularmente sobre a produção e qualidade espermática do sémen do coelho.

Apesar de alguma mortalidade, ou perda de machos ao longo do período experimental, foi possível obter ejaculados de cerca de 75% dos machos desde o início até ao fim do estudo. Relativamente a falhas na colheita, a mais frequente em ambos os genótipos, foi a não realização de salto. Tendo-se proporcionado aos machos todas as condições estimuladoras para que estes realizassem o salto necessário à obtenção do sémen, podemos inferir que a sua não realização poderia estar relacionada com a libido de cada macho. São vários os trabalhos (Nizza *et al.*, 2003; Ain-Baziz *et al.*, 2012) que referem alterações sazonais da libido dos machos, quando expressa pelo tempo entre a colocação da coelha na jaula e o salto. Nesses estudos, , quando comparado o verão com outras estações do ano, observou-se um maior intervalo de tempo até ao salto, indicador de menor libido nessa estação. No presente estudo não se verificou qualquer tendência para não realização de saltos numa estação em particular, pelo que não deveremos considerar que essas falhas se deveram à falta de libido mas sim, provavelmente, a modificações ou perturbações pontuais do comportamento.

Já no que respeita à realização de saltos sem ejaculação, e pondo de parte qualquer falha nas condições necessárias para que tal pudesse ter acontecido, estas ocorreram apenas nos machos GE e de forma mais frequente na estação mais quente e na sequência desta (> 60% no verão e 88% no conjunto verão mais outono).

Neste caso e considerando as potenciais consequências nefastas do stress térmico na função reprodutora dos machos (Marai *et al.*, 2002) poderemos, pelo menos parcialmente, imputar à estação do ano uma justificação para estas falhas.

Da análise geral dos ejaculados, neste caso conjuntos de ejaculados, verificamos que, quer global, quer individualmente para cada genótipo, os valores das avaliações macroscópicas e microscópicas estão enquadrados nos valores reportados para machos de vários genótipos desta espécie.

O volume de ejaculado de 0,7mL enquadra-se nos valores observados por Ain-Baziz *et al.* (2012), El-Masry *et al.* (1994), Pascual *et al.* (2004) e Safaa *et al.* (2008). Há que salientar, no entanto, que comparado especificamente com os poucos resultados que conseguimos obter na bibliografia para os genótipos estudados, esse mesmo valor está um pouco abaixo dos valores reportados quer para o genótipo VT (Vicente e Viudes de Castro, 1996), quer para o genótipo GE (López e Sierra, 1998 e Mocé *et al.*, 2005).

A motilidade massal e o grau de aglutinação, tal como determinadas no nosso estudo não serão diretamente comparáveis com os valores da bibliografia, pois pela leitura dos artigos que pudemos consultar, não nos fica claro se os critérios de observação (se pontuam os movimentos de massas de SPZ ou a velocidade dos SPZ individualmente) e de pontuação são ou não equivalentes. Por exemplo, num estudo recente Najjar *et al.* (2013) utilizaram uma escala de 0 a 9, seguramente bastante diferente da nossa. Também num estudo de Herbert e Trigg (2005) a motilidade massal foi pontuada de 0 a 4, tornando difícil a confrontação de resultados. Assim, não iremos discutir, em comparação, os valores de motilidade massal e aglutinação.

A concentração espermática média da globalidade dos ejaculados é comparável aos valores reportados por Pascual *et al.* (2004) embora esteja abaixo dos valores observados por outros autores (Nizza *et al.*, 2003; Castellini, 2008; Safaa *et al.*, 2008). Uma observação atenta do quadro 10 desta dissertação (capítulo Revisão Bibliográfica) permite verificar que a concentração espermática é seguramente um dos parâmetros do espermograma de coelho mais variável, tal como também afirmado por Khalil *et al.* (2007). Quando confrontados diretamente com os valores de referência para os genótipos estudados, verificamos que nos animais GE o valor médio ( $144 \times 10^6$  SPZ/mL) é comparável aos reportados por López e Sierra (1998) e Mocé *et al.* (2005). No entanto, o valor médio, e até mesmo o extremo máximo ( $96$  e  $130 \times 10^6$  SPZ/ml,

respetivamente) estão bastante abaixo do valor de referência referido por Vicente e Viudes de Castro (1996). Estes valores vão, no entanto, ao encontro das informações dos técnicos da exploração que realizam de rotina as colheitas de sémen, preparação de doses de IA e realização das IA. Na medida em que não nos foi possível encontrar mais valores de referência para o genótipo VT, não temos qualquer explicação para esta discrepância de valores.

No que respeita à percentagem de SPZ vivos, os valores de cerca de 90% observados no nosso estudo são próximos, sendo mesmo ligeiramente superiores aos reportados na bibliografia para este parâmetro por El-Masry *et al.* (1994), Nizza *et al.* (2003) ou Safaa *et al.* (2008). Não dispomos na bibliografia consultada de valores para este parâmetro para os genótipos VT ou GE.

A percentagem de SPZ morfológicamente normais, variando entre os 73 e os 98%, também está perfeitamente enquadrável nos valores da bibliografia (Ain-Baziz *et al.*, 2012; El-Masry *et al.*, 1994; Pascual *et al.*, 2004 e Safaa *et al.*, 2008). Comparando com os valores para os genótipos estudados verifica-se que nos animais VT, a percentagem do nosso estudo é bastante inferior à de 99% reportada por Vicente e Viudes de Castro (1996). Não colocando naturalmente em causa o valor apresentado pelos autores citados, não podemos no entanto ficar indiferentes ao facto deste ser bastante superior a todos os reportados na bibliografia consultada e acima citada, podendo ser uma situação muito pontual de sémen de qualidade muito elevada. Já os valores reportados para o genótipo GE por Lopéz e Sierra (1998) e Mocé *et al.* (2005) são equivalentes aos observados no presente trabalho.

O número total de SPZ varia entre os 32 e os  $139 \times 10^6$  SPZ/mL, enquadra-se nos valores apresentados por Lambiase e Amann (2013). Verifica-se também que no genótipo VT os valores do número total de SPZ são numericamente inferiores aos obtidos para o genótipo GE em todas as estações do ano, sendo significativas as diferenças no inverno e primavera. Tal como esperado, o número total de SPZ está positiva e muito significativamente correacionado com a concentração espermática e o volume médio do ejaculado.

Centrando a discussão nos efeitos da estação do ano sobre as características do sêmen verificamos a ausência de efeito sobre a aglutinação, concentração espermática e número total de espermatozóides no ejaculado. As percentagens de espermatozóides vivos e normais foram significativamente influenciadas pela estação do ano, pese embora esse efeito só se tenha verificado, relativamente aos espermatozóides vivos, num dos genótipos. Embora apresentando uma tendência em termos estatísticos, a estação do ano não influenciou significativamente nem o volume nem a motilidade massal. Por outro lado, na comparação de genótipos, apenas se verificaram diferenças estatisticamente significativas na concentração espermática e número total de espermatozóides. A interação genótipo x estação foi sempre não significativa.

No que respeita ao volume de ejaculado, a bibliografia consultada apresenta vários resultados. Por exemplo, Safaa *et al.* (2008) verificaram ejaculados menos volumosos no verão enquanto Nizza *et al.* (2003) reportam o contrário. Ainda El-Masry *et al.* (1994) não encontraram diferenças no volume entre o verão e o inverno. Apesar de alguns destes resultados aparentemente contraditórios ou, pelo menos, indiciadores de ausência de efeito negativo no verão, a maior parte dos estudos reportam efetivamente um menor volume de sêmen no verão. O menor volume de ejaculado pode ser resultado de menor número de espermatozóides e/ou diminuição do volume do plasma seminal (Macirone e Walton, 1983 citados por Marai *et al.*, 2002) ou por hipoatividade das glândulas sexuais acessórias e testículos devido ao efeito adverso das elevadas temperaturas ambientes (El-Sherbiny, 1994 e Zeidan *et al.*, 1997 citados por Marai *et al.*, 2002). Como os níveis de secreção das glândulas acessórias e a espermatogénese são controladas pela testosterona, as concentrações desta última, inferiores no verão (El-Masry *et al.*, 1994), poderão justificar os menores volumes.

No que concerne à motilidade massal e grau de aglutinação, as circunstâncias já referidas acima nesta discussão não nos permitem efetuar uma discussão aprofundada dos resultados, que aliás demonstraram uma ausência de efeitos, quer do genótipo, quer da estação do ano. Relativamente à motilidade massal e numericamente, o menor valor nos animais VT e um dos dois mais baixos dos machos GE foram observados no verão. A ausência de significância estatística poderá portanto refletir um número insuficiente de amostras, sobretudo para um dos parâmetros do sêmen de coelho que apresenta maior variabilidade (Khalil *et al.*, 2007) ou alguma insensibilidade destes animais, nas



condições de exploração concretas, aos efeitos nefastos do verão, pelo menos no que respeita a este parâmetro de mobilidade dos espermatozóides.

Relativamente à percentagem de SPZ vivos no ejaculado, os valores observados entre os 87 e os 94% estão enquadrados nos referidos em estudos da bibliografia consultada (Khalil *et al.* 2007; Safaa *et al.*, 2008) mas são superiores a outros (El-Masry *et al.*, 1994; Nizza *et al.*, 2003). Os valores citados por Marai *et al.* (2002) também são bastante inferiores aos por nós observados mas, as fontes bibliográficas citadas são de estudos que pretendem refletir os efeitos nefastos do *stress* térmico nos machos.

O valor mais baixo no sémen dos machos VT (neste caso significativamente inferior ao do outono) e um dos dois valores mais baixos dos machos GE foram observados no verão. Estes resultados têm paralelo nos observados por Safaa *et al.* (2008) comparando o verão ao inverno, embora comparando as mesmas estações do ano Nizza *et al.* (2003) e El-Masry *et al.* (1994) não tenham observado diferenças significativas entre estações.

A percentagem de SPZ normais no ejaculado foi influenciada pela estação do ano. Os valores são equiparáveis aos relatados na maioria da bibliografia (El-Masry *et al.*, 1994; Nizza *et al.*, 2003; Khalil *et al.*, 2007; Rodriguez de Lara *et al.*, 2008; Ain-Baziz *et al.*, 2012). Em ambos os genótipos, o valor mais baixo deste parâmetro foi observado no verão, corroborando as observações de Safaa *et al.* (2008) e Ain-Baziz *et al.* (2012). As influências nefastas das temperaturas mais elevadas sobre o processo da espermatogénese e maturação e armazenamento dos espermatozóides e a já referida diminuição dos níveis de testosterona, explicarão em grande medida os resultados apresentados. O processo da espermatogénese requer um ambiente térmico testicular muito particular, caracterizado pela temperatura inferior à temperatura do resto do corpo do animal (Hafez, 2000). O *stress* térmico dificulta em menor ou maior grau a capacidade de termorregulação testicular, pelo que os efeitos do calor na qualidade do sémen podem ser mais ou menos expressivos. O processo de espermatogénese, maturação espermática e armazenamento são dependentes de níveis ideais de testosterona (Hafez, 2000) pelo que a sua menor concentração ao nível testicular e/ou epididimário tornará estes processos menos eficientes.

A concentração espermática não apresentou, em nenhum dos genótipos variações significativas devidas à estação do ano. Esta ausência de efeito sazonal na

concentração espermática foi verificado por El-Masry *et al.* (1994) e Scapinello *et al.* (1997), no entanto foi observado nos estudos de Pascual *et al.* (2004), Safaa *et al.* (2008) e Rodriguez de Lara *et al.* (2008) tendo sido observada uma menor concentração no verão e uma maior concentração na primavera. A ausência de significância entre a correlação, naturalmente negativa entre a concentração e o volume espermático, poderá pelo menos parcialmente dever-se ao facto de termos analisado conjuntos de ejaculados e não ejaculados individuais.

A produção espermática efetiva, revelada pelo número total de espermatozoides, não foi influenciada pela estação do ano, sendo que a superioridade neste parâmetro (significativa no inverno e primavera) nas amostras dos animais GE encontram explicação na sua maior concentração espermática e igual volume.

Apesar das comparações e discussão para as causas dos efeitos sazonais observados, parece-nos numa análise mais ampla que os efeitos sazonais não foram muito marcantes nos animais e período em estudo. Justificamos esta percepção pelo facto de: i) os efeitos não terem permitido uma divisão clara entre as estações consideradas supostamente mais favorável (primavera) e desfavorável (verão) na maior parte dos parâmetros analisados; ii) alguns parâmetros que estão descritos na bibliografia como sendo bastante influenciáveis pela estação do ano (motilidade, concentração) não terem sofrido em nenhum dos génotipos essa influência e iii) alguns dos efeitos verificados não terem sido observados em ambos os génotipos. Aliás, os resultados não nos permitem de forma clara identificar qualquer dos génotipos como sendo mais “tolerante” aos efeitos negativos das estações mais desfavoráveis do ano.

Os efeitos da estação do ano, muitos ligados às variações do fotoperíodo e temperatura ambiente, podem e deverão ser controlados ou atenuados pelas condições de produção dos animais através da adequação das instalações, manejo, alimentação, etc. A exploração onde foi realizado o estudo, não dispunha em nenhum dos pavilhões/salas (incluindo a dos machos) de sistemas de controlo térmico, apenas de ventilação. A luz era artificial, logo controlável, mas está situada numa região do país caracterizada por verões considerados suaves (média da temperatura máxima entre os 15 e 25° C entre 1981 e 2010, fonte: IPMA, consulta em 18/09/2013) sobretudo quando comparada com outras zonas de Portugal. Assim, podemos presumir que este é um

desses casos em que a envolvente climática, associada a instalações suficientes (embora não perfeitas) e um maneio correcto, conseguem obviar os problemas reprodutivos eventualmente resultantes das estações do ano.

A análise e discussão dos resultados reprodutivos das coelhas deverão ser realizadas com a consciência clara que estes são decorrentes da utilização de apenas uma parte dos ejaculados analisados neste estudo. Adicionalmente são resultados agregados, ou seja com os dois génotipos misturados. Independentemente do facto acima referido podemos comparar os resultados reprodutivos com os observados noutros estudos e também para os génotipos em causa.

Os valores médios de nascidos totais, nascidos vivos e desmamados apresentados no nosso trabalho estão concordantes com os referidos nas escassas referências onde são apresentados dados específicos dos génotipos estudados por Sierra e Lopez (1990), Lopéz *et al.* (1994) e Gomez *et al.* (1999), para os mesmos parâmetros ou seja, nascidos totais (8,2 – 11,6), nascidos vivos (7,7 – 10,9) e desmamados (5,8 – 9). Mesmo em trabalhos onde os mesmos parâmetros são apresentados incluindo, por exemplo a linha VT (embora conjuntamente com outras linhas ou cruzamentos) como os de Rabag e Baselga (2011) e Rabag *et al.* (2012), os valores são comparáveis aos por nós observados o que indica que a performance reprodutiva da exploração está concordante com o que é expectável para os génotipos em causa. Também no que respeita à taxa de mortalidade entre o nascimento e o desmame, os nossos valores estão perfeitamente em linha com os referenciados nas fontes acima citadas.

Tentando aquilatar algum efeito sazonal na performance reprodutiva das coelhas, podemos apenas verificar que as melhores taxas de partos foram observadas no final do inverno e primavera, o que está em acordo com o efeito positivo da primavera sobre a função reprodutiva quer dos machos, quer das fêmeas desta espécie. Relativamente a todos os outros parâmetros não se verifica qualquer tipo de tendência que permita classificar as estações do ano como sendo mais ou menos desfavoráveis. Tal observação vem também reforçar a ideia, acima descrita, de que as condições ambientais externas (da localização geográfica da exploração) conjuntamente com as condições infraestruturais da exploração e o maneio, permitem, em grande medida, obter uma performance reprodutiva regular ao longo do ano, o que aliás deverá ser objetivo de qualquer empresa de produção animal.

## 5. CONCLUSÃO

Este trabalho tinha como grande objetivo estudar características do sémen de coelhos de dois genótipos e as eventuais variações destas ao longo de um ano, para testar a existência de efeitos sazonais. Esse objetivo, parece-nos, foi cumprido e obtivemos um conjunto de dados importantes para um melhor conhecimento da fisiologia reprodutiva destes animais.

Os resultados específicos já foram objeto de discussão pelo que nesta conclusão limitar-nos-emos a realçar os resultados mais importantes, sublinhar os pontos fracos deste estudo e sugestões para investigações futuras nesta área.

Os resultados obtidos em todos os parâmetros estavam em linha com os valores de referência, quer para os genótipos estudados, quer comparando com outros genótipos de produção de carne. A única exceção, para a qual continuamos sem explicação, foi a concentração espermática nos ejaculados dos machos VT (bastante inferior aos valores publicados). As estações do ano, e claro, as variações a elas associadas de temperatura e duração do fotoperíodo, tiveram algum impacto nas características do sémen dos animais com uma tendência para menor quantidade e qualidade dos espermatozóides no verão. No entanto, essa influência não nos pareceu muito forte, ou seja, não parece ter existido, no ano em causa, um forte impacto sazonal. Os dados reprodutivos das coelhas e ninhadas que pudemos obter também indiciam essa fraca influência sazonal.

Os pontos fracos do nosso estudo têm principalmente a ver com as condicionantes de ter sido realizado numa exploração comercial e não em ambiente experimental. Tal facto, embora possa trazer vantagens, sobretudo na capacidade de conhecer e contactar com a atividade produtiva real, traz também algumas condicionantes, neste caso e a saber: impossibilidade de trabalhar e estudar especificamente cada ejaculado individual; limitações ao nível das análises laboratoriais, quer por falta de meios (ex. ampliação microscópica para avaliação do estado dos acrossomas), quer por necessidade de conciliação de atividades laboratoriais (avaliações, preparação de doses para IA) de várias pessoas ao mesmo tempo e também de tempo; impossibilidade de ter dados concretos da utilização do sémen dos machos estudados, nomeadamente no que respeita aos resultados reprodutivos das coelhas com ele inseminadas.

Há também, pelo menos uma falha que nos pode ser imputada diretamente e que, naturalmente, reconhecemos. Trata-se da ausência de recolha de dados, ao longo do período experimental, acerca das condições ambientais da sala dos machos e, eventualmente, das fêmeas. Se o ideal seria ter um conjunto alargado de dados como a temperatura, humidade relativa, luminosidade (duração e intensidade), teria sido possível, sem grande dificuldade, obter os valores de temperatura da sala dos machos, pelo menos, nos dias das colheitas, pese embora saibamos que os efeitos negativos das altas temperaturas possam verificar-se bastante tempo após estas já terem ocorrido.

De entre as sugestões de estudos futuros indicamos: a confirmação dos valores de concentração espermática dos machos VT; o estudo mais específico (ejaculados individuais e relação sémen – produtividade) para maior segurança nas avaliações; a extensão deste tipo de estudos em ambiente de exploração a outras no país, sobretudo naquelas em que as condições ambientais possam ser mais extremas (quer por causa da localização geográfica, quer devidas às condições das instalações) e finalmente, no estudo de medidas de maneio concretas e a todos os níveis que possam conduzir ao aumento da produtividade das cuniculturas, pois a eficiência reprodutiva é seguramente um fator chave para a sua viabilidade económica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ✓ Ain-Baziz, H.; Boulbina, I.; Ilès, I.; Belabbas, R.; Zenia, S.; Temim, S. (2012). *Influence of environmental temperature and relative humidity on semen characteristics in male rabbit (Oryctolagus cuniculus) of local algerian population*. World Rabbit Science Association. 10 th World Rabbit Congress, Egipto;
- ✓ Baggeto, J. (1918). *Principales razas de conejos: Conejo Gigante de España*. España Avícola, Ano II, nº 43, 13pp;
- ✓ Baselga, M.; Gómez, E.; Cifre, P. e Camacho, J. (1992). *Genetic diversity of litter size traits between parities in rabbits*. J. Appl. Rabbit Res., 15: 198-205;
- ✓ Bakker, J. e Baum, M. J. (2000). *Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators*. Front Neuroendocrinol; 21:220-262;
- ✓ Bolet, G.; Esparbie, J.; Falières, J. (1996). *Relations entre le nombre de foetus par corne utérine, la taille de portée á la naissance et la croissance pondérale des lapereaux*. Ann. Zootech., 45: 185-200;
- ✓ Bolet, G.; Bidanel, J. P.; Ollivier, L. (1998). *Selection for litter size in pigs: efficiency of closed and open nucleus strategies*. Genet. Sel. Evol.;
- ✓ Bolet, G.; Brun, J. M.; Lechevestrier, S.; Lopez, M.; Boucher, S. (2004). *Evaluation of the reproductive performance of eight rabbit breeds on experimental farms*. Anim. Res. 53: 59–65;
- ✓ Bourdage, R. J. e Halbert, S. A. (1980). *In vivo recording of oviductal contractions in rabbits during the periovulatory period*. Am J Physiol; 239: 332-336;
- ✓ Brito, L. F. C.; Barth, A. D.; Bilodeau – Goessels, S.; Panich, P. L.; Kastelic, J. P. (2003). *Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate*. Theriogenology, 60: 1539-1551;
- ✓ Brito, C. (2007). *Evaluation of stallion sperm morphology*. Clinical Techniques in Equine Practice, 6: 249-264;
- ✓ Caillol, M.; Dauphin-Villemant C.; Martinet, L. (1983). *Oestrous behaviour and circulating progesterone and oestrogen levels during pseudopregnancy in the domestic rabbit*. J Reprod Fertil; 69:179-186;

- ✓ Carvalho, R. C. (2009). *Caracterização da produção cunícola nas regiões de Trás-Os-Montes, Minho e Galiza*. Tese de Mestrado em Engenharia Zootécnica. UTAD, Vila Real. 132 pp;
- ✓ Carvalho, R. (2011). *Caracterização da Cunicultura Intensiva no Norte de Portugal*. Livro de Comunicações das III Jornadas da ASPOC e V Jornadas Internacionais de Cunicultura da APEZ. pp. 55-60;
- ✓ Castellini, C. (2008). *Semen production and management of rabbit bucks*. 9th World Rabbit Congress, Itália, 10(13): 265-278;
- ✓ Cifre, J.; Baselga, M.; Gómez, E. A.; García, M. L. (1994). *Effect of embryo cryopreservation techniques on reproductive and growth traits in rabbits*. Ann. Zootech., 48: 15-24;
- ✓ Dufy-Barbe, L.; Franchimont, P.; Faure, J. M. (1973). *Time-courses of LH and FSH release after mating in the female rabbit*. Endocrinology; 92:1318-1321;
- ✓ El-Masry, K. A.; Nars, A. S.; Kamal, T. H. (1994). *Influences of season and dietary supplementation with selenium and vitamin E or zinc on some blood constituents and semen quality of new zealand white rabbit males*. World Rabbit Science. 2(3): 79-86;
- ✓ European Food Safety Authority (2005). *The reality of commercial rabbit farming in Europe*. [Online] Disponível em: [http://www.caft.org.uk/factsheets/rabbit\\_fur\\_report.pdf](http://www.caft.org.uk/factsheets/rabbit_fur_report.pdf) [Consultado em 13 de Julho de 2013];
- ✓ Estany, J.; Baselga, M.; Blasco, A.; Camacho, J. (1989). *Mixed model methodology for the estimation of genetic response to selection in litter size of rabbits*. Livest. Prod. Sci., 21: 67-76;
- ✓ Food and Agriculture Organization (2009). *Animal Genetic Resources*. Editor-in-Chief. Disponível em: <http://www.cbd.int/iyb/doc/prints/iyb-fao-animalgeneticresources-en-fr-es.pdf>. [Acedido em 13 de Julho de 2012];
- ✓ Fayeye, T. R.; Ayorinde, K. L. (2008). *Effects of season, generation, number of mating, parity and doe number of teat on doe and litter birth characteristics in domestic rabbit*. 9th World Rabbit Congress. pp 1529-1533;

- ✓ Fernandes, A. R. G. (2009). *Projeto para instalação de uma cunicultura*. Tese de Mestrado em Engenharia Zootécnica. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. 79 pp;
- ✓ Ferré, J. S.e Rosell, J. M. (2000). *Capítulo III: Alojamiento e Patología*. Enfermedades del conejo Tomo I: Generalidades. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, Espanha. pp 169-210;
- ✓ Frangiadaki, E.; Golidi, E.; Menegatos, I.; Luzi, F. (2003). *Comparison of doe's performances under high and moderate temperature in a Greek commercial farm*. World Rabbit Science. 11: 137-143;
- ✓ Gerencsér, Zs.; Matics, Zs.; Nagy, I.; Princz, Z.; Orova, Z.; Biró-Németh, E.; Radnai, I.; Szendrő, Zs. (2008). *Effect of a light stimulation on the reproductive performance of rabbit does*. Kaposvár University, Faculty of Animal Science, Hungria. 4 pp;
- ✓ Gómez, E. A.; Baselga, M.; Rafel, O.; García, M. L.; Ramón, J. (1999). *Selection, diffusion and performance of six Spanish lines of meat rabbit*. Options Méditerranéennes, Series Cahiers, 41: 147-152;
- ✓ González-Redondo, P.; Negretti, P.; Finzi, A. (2008). *Analysis of the efficiency and the reproductive seasonality of an alternative rabbit keeping system*. 9th World Rabbit Congress. pp 1545-1549;
- ✓ Hafez, E. S. E. (2000). *Reproduction in farm animals*. 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 509p;
- ✓ Herbert, C. A.; Trigg, T. E. (2005). *Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals*. Animal Reproduction Science, 88: 141–153;
- ✓ Hoffmann, R. S. e Smith, A. T. (2005). *Lagomorphs*. Mammal Species of the World, 3<sup>a</sup> Edição, pp. 185-211;
- ✓ Instituto Nacional de Estatística (2011). *Estatísticas Agrícolas 2010*. Estatísticas oficiais;
- ✓ Jones E. F.; Bain J. B.; Odell W. D. (1976). *Postcoital luteinizing hormone release in male and female rabbits as determined by radioimmunoassay*. Fertil Steril., 27: 848-852;



- ✓ Khalil, M. H.; Al-Sobayil, K. A.; Al-Saef, A. M.; García, M. L.; Baselga, M. (2007). Genetic evaluation for semen characteristics in a crossbreeding project involving Saudi and Spanish V-line rabbits. *The Animal Consortium*. 1:7, 923–928;
- ✓ Lacomba, V. (1919). *Origen de la raza de conejos "Gigantes de España"*. *España Avícola*, Año III, nº 48;
- ✓ Lambiase, J. T. e Arman, R. P. (2013). *The male rabbit. v. changes in sperm reserves and resorption rate induced by ejaculation and sexual rest*. *J. Anim. Sci.* 28: 542-549;
- ✓ Lavara, R.; Moce, E.; Andreu, E.; Pascual, J. J.; Cervera, C. (2000). *Effects of environmental temperature and vitamin supplements on seminal parameters from a rabbit line selected by high growth rate*. VII World Rabbit Congress. 8(4): 181-184;
- ✓ López, M., Sierra, I., Vicente, F.; Conesa, A. (1994). *The effects of changing the remating interval according to the previous litter size on the reproductive performances of the doe rabbit*. *Options Méditerranéennes, Series Cahiers*, 8: 337-345;
- ✓ López, M. e Sierra, I. (1998). *Razas y poblaciones autóctonas de conejos domésticos*. *Archivos de Zootecnia*, 47 (178-179): 467-471;
- ✓ Maertens, L. (2000). *Perspetivas futuras da cunicultura*. I Jornadas Internacionais de Cunicultura. Vila Real, Portugal. pp 187-195;
- ✓ Marai, I. F. M.; Habeeb, A. A. M.; Gad, A. E. (2002). *Rabbits' productive, reproductive and physiological performance traits as affected by heat stress: a review*. *Livest. Prod. Sci* 78: 71–90;
- ✓ Meredith, A; Crossley, D. A. (2002). *Exotic Pets*. In: Meredith A, Redrobe S, eds. *BSAV Manual of Exotic Pets* (4ªed.). England, BSAVA, 8:76-92;
- ✓ Mocé E., Vicente J. S., Lavara R., Viudes de Castro M. P., Lopéz M, Bolet G. (2005). *Characteristics of fresh semen from eight rabbit breeds*. *Reprod. Domest. Anim.*, 40: 388-398;

- ✓ Monteiro, J. M.; Lindo, I. C.; Alexandre, C.; Alexandre C. (2013). *Enquadramento do sector da cunicultura PAC 2013. Estratégia para uma cunicultura sustentável.* [Online] Disponível em: <http://www.aspoc.pt/attachments/article/191/Cunicultura%20%20PAC%202013.pdf>. [Consultado em 13 de Julho de 2013];
- ✓ Mourão, J. L. M. (2003). *Produção de Leporídeos. O Coelhos em Zootecnia.* UTAD, Vila Real. 62 pp;
- ✓ Mourão, J. L. M.; Pinheiro, V. M. C. (2004). *Produção de Carne em Cunicultura.* UTAD, Vila Real. 101 pp;
- ✓ Najjar, A.; Bem, S. S.; Najjar, T.; Kalamoun, S.; Bem, K. N., Bem, A. E.; Ben M. M. (2013). *Influence of Vitamins C and E on Sperm Motility of Rabbit bucks.* World Rabbit Science. 21: 45-48;
- ✓ Nizza, A.; Meo di C.; Taranto, S. (2003). *Effect of Collection Rhythms and Season on Rabbit Semen Production.* Reprod Dom Anim, 38: 436–439;
- ✓ Oliveira, J. M. A. C. (1979). *Cunicultura - Aspectos práticos da criação racional de coelhos.* Colecção Agros, Lisboa. 196 pp;
- ✓ Pascual, J. J.; García C.; Martínez, E.; Mocé, E.; Vicente, J. E. (2004). Rearing management of rabbit males selected by high growth rate: the effect of diet and season on semen characteristics. Reprod. Nutr. Dev., 44: 49–63;
- ✓ Ragab, M. e Baselga M. 2011. *A comparison of reproductive traits of four maternal lines of rabbits selected for litter size at weaning and founded on different criteria.* Livest. Sci., 136: 201-206;
- ✓ Ragab, M.; Vicente, J. S.; Lavara, R.; Desantes, J.; Baselga, M. (2012). *Relationships between ovulation rate, litter size and prenatal survival components in rabbit does.* World Rabbit Science Association. 10th World Rabbit Congress, Egipto, 3(6): 367-371;
- ✓ Rodríguez de Lara, R.; Fallas-López, M.; Rangel-Santos, R.; Mariscal-Aguayo, V.; Martínez-Hernández, P. A.; García Muñiz, J. G. (2008). *Influence of doe exposure and season on reaction time and semen quality of male rabbits.* 9th World Rabbit Congress, Itália, 10(13): 443-448;
- ✓ Rosell, J. M. (2000). *Enfermedades del conejo.* Barcelona, Espanha. Ediciones Mundi-Prensa;

- ✓ Rosell, J. M. (2004). *Características más destacadas de los animales disponibles en la Península Ibérica*. Revista de Sol a Sol. Fábricas de Moagem do Marco, S.A. nº6: 24-27;
- ✓ Safaa, H. M.; Emarah, M. E.; Saleh, N. F. A. (2003). *Seasonal effects on semen quality in black baladi and white new zealand rabbit bucks*. World Rabbit Sci. 16: 13 – 20;
- ✓ Scapinello, C.; Furlan, A. C.; Oliveira, P. B.; Faria, H. G.; Pedro, M. R. S.; Machado, R. M. (1997). *Development of growing rabbit feeds with different levels of restorative yeast (Saccharomyces spp.) dried by spray-dry method*. Revista Unimar, 19:913-921;
- ✓ Sierra, I. e López, M. (1990). *Reconstitution de la race Géant d'Espagne. Situation actuelle*. Options Méditerranéennes, Series A, 8: 83-87;
- ✓ Silva, A. (2002). *Controle Ambiental em Cunicultura Industrial*. II Jornadas Internacionais de Cunicultura. Vila Real, Portugal. pp 103-110;
- ✓ Testik, A. (1996). *The situation of rabbit production and production performance of some exotic rabbits in Turkey*. In: Proceedings of the 6th World Rabbit Congress, Vol. 3, Toulouse (France). pp. 435-436;
- ✓ Théau-Clément M. e Roustan A. (1991). *A study on relationships between receptivity and lactation in the doe, and their influence on reproductive performances*. J. Appl. Rabbit Res.,15: 412–421;
- ✓ Urdiales, R. G. (2005). *Bioestimulação na coelha reprodutora – Alternativa aos tratamentos hormonais?* Revista Cunicultura. pp. 7-17;
- ✓ Venâncio C. A; Ferreira D. O; Colaço B. J; Teixeira J. T; Pinheiro V. M; Lacilla J. M. (2007). *Particularidades anatómicas do coelho*. Vila Real, Portugal. UTAD;
- ✓ Vicente, J. S.; Viudes de Castro, M. P. (1996). *A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen*. Reprod. Nutr. Dev., 36: 485-492;
- ✓ Vicente, J. S. (1998). *Curso Superior de Produccion Animal*. Reproduccion Animal. IAMZ-CIHEAM, Zaragoza. pp. 15-16;
- ✓ Xiccato, G. e Trocino, A. (2007). *Italy, a system of integrated rabbit production*. Livro de Comunicações do II Congresso Ibérico de Cunicultura. pp. 175-184;
- ✓ Yamani, K. A. (1994). *Rabbit meat production in Egypt*. Options Méditerranéennes, Series Cahiers, 8: 57-64;

- ✓ Zúccari, C. E. S. N.; Carrijo, P. R.; Leite, P. A.; Scaldelai, P. R. R.; Rodovalho, N. C. M.; Zanenga, C. A.; Kiefer, C.; Costa e Silva, E. V. (2008). *Seleção em gradiente de Percoll® sobre os parâmetros espermáticos do sêmen bovino congelado*. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 9: 358-366.

# **ANEXOS**

## **ANEXO I** – Ficha de recolhas de sémen

## REGISTO DE RECOLHAS DE SEMÉN – COELHOS

Nº do Macho	Data	Operador	Cor	Gel	Sedimento	Volume (ml)	Mobilidade (escala 0 a 5)	Aglutinação (0 a +++)

Escala 0 a 5

Aglutinação +++ muito evidente

**0 – Imóveis ou mortos.**

**1 – Sem movimentos progressivos, rodando sobre si mesmos.  
(cabeça dos espermatozóides ficam fixas só movem as caudas)**

**2 – Com movimentos anormais (em círculos).**

**3 – Com movimentos progressivos lentos ou sinuosos.**

**4 – Com movimentos rápidos e progressivos.**

**5 - Com movimentos progressivos muito rápidos.**

**ANEXO II** – Ficha de morfología/anomalias espermáticas



Nº coleta	Estado																																																																								

Nº coleta	Estado																																																																								

**V** – Vivo  
**M** - Morto

**ANEXO III** – Protocolo câmara de *Neubauer*

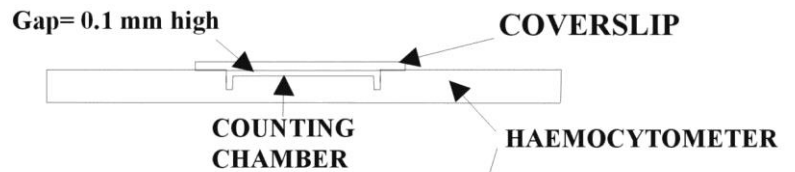
**HAEMOCYTOMETER INSTRUCTION SHEET**  
(for improved Neubauer Haemocytometer)

**PLEASE NOTE:** The haemocytometer is made of glass, so do not drop it! Only the cover slip provided with the Haemocytometer, which requires a special one, should be used with it.

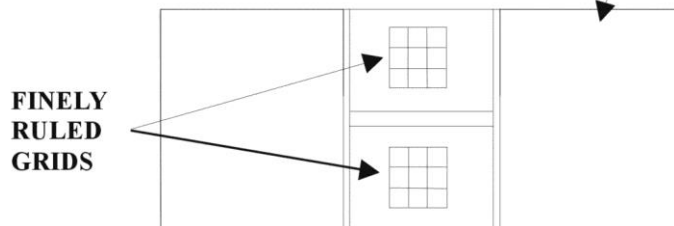
**DESCRIPTION.**

The haemocytometer has a central area, slightly lower (0.1 mm) than the rest of surface of the slide. This depression forms the counting area/ chamber (Figure 1a; below).

**Figure 1a. Side view of Haemocytometer**



**Figure 1b. Top view of Haemocytometer**

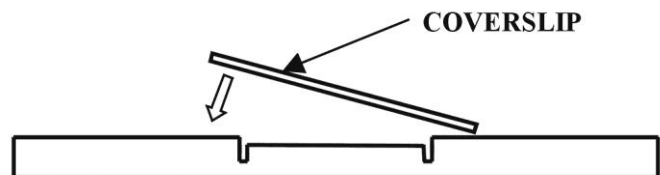


Looking at the surface of the slide; finely ruled areas that form grids can be seen (Figure 1b; above). These define an area on the slide of a known size. The area measured from the grid and the height between the slide and the base of the depression of the counting area defines a known volume. By counting the cells or other objects in this volume the no. of cells etc. per unit volume can be calculated and this value used to give the number in the original volume.

**INSTRUCTIONS FOR USE**

(1). Ensure both the haemocytometer and it's cover slip are clean. If they are dirty wash them in distilled water and then wipe them over with alcohol. When dry breath on the surface of the haemocytometer and quickly place the cover slip in position so that it is centred over the counting chamber.

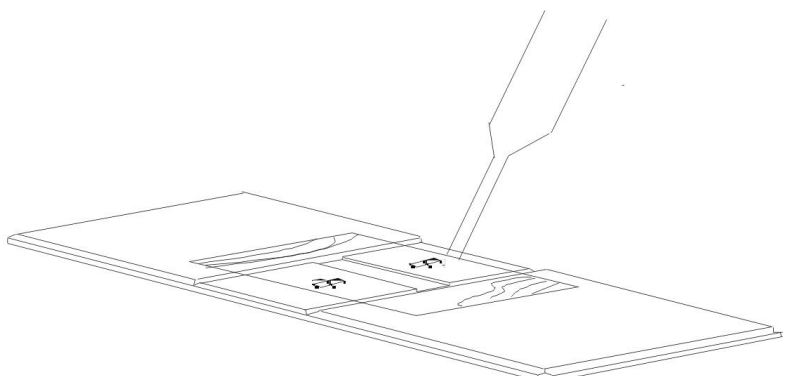
**Figure 2.**



(2). Gently, but firmly press down on the cover slip, using a thumb placed either side, holding the haemocytometer firmly between both hands, until Newton's rings (refraction rings of light of a rainbow/oil slick coloration) are seen. If no rings are seen try again. If problems are experienced obtaining rings, e.g. on a hot day, then cool the haemocytometer under running cold water for few minutes before drying and then trying to the mount the cover slip again.

(3). Take (suck) up a small amount of the cell suspension/solution to be counted in a fine tipped Pasteur pipette. Gently touch the pipette against the side of the cover slip where it touches the base of the depression (Figure 3, below). A drop of liquid should be drawn out of the pipette and into the chamber. If it is not then gently and slowly squeeze out one drop. This will fill one counting chamber. If both chambers are to be used then repeat for the other chamber.

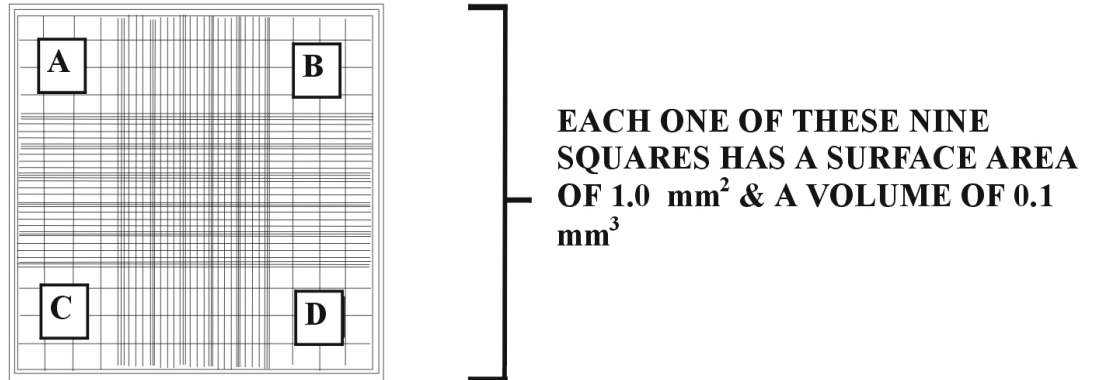
**Figure 3.**



(4). Place the haemocytometer under a microscope. Turn the microscope on and under low power (\*5/\*10) focus on the grid area of the counting chamber. **PLEASE NOTE:** do not take too long to count as the liquid will start to evaporate from the sides of the chamber, and the chamber dry out, with the heat of the lamp.

(5). Under the microscope the grids area can be seen to be formed of 9 large squares in a 3\*3 grid (Figure 4; below). Each of these squares covers an area of 1 mm<sup>2</sup> which, with the depth of the chamber being 0.1 mm, means that the volume of each large square is 0.1 mm<sup>3</sup>.

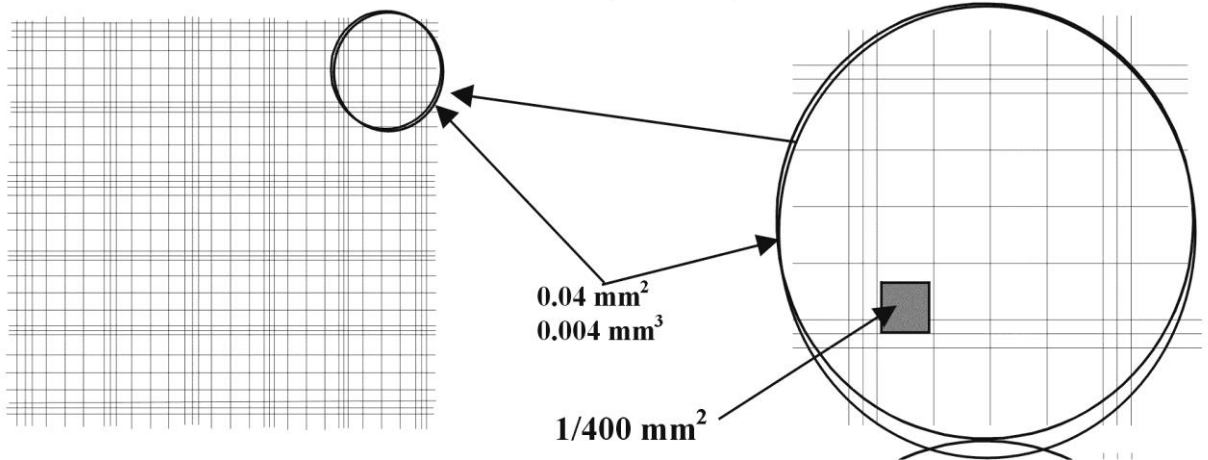
**Figure 4.**



The central area of the grid is made up of triple ruled lines that in the centre form a 5\*5 grid of 25 squares with a total volume of 0.1 mm<sup>3</sup> (Figure 4, above, and Figure 5a, below). Each of these 25 squares has an area of 0.04 mm<sup>2</sup> and a volume of 0.004 mm<sup>3</sup>. Each one of these 25 squares is further divided up into 16 smaller ones in a 4\*4 grid (Figure 5b, below). Each of these 16 smaller squares has a surface area of 1/400 mm<sup>2</sup> (0.0024 mm<sup>2</sup>) and a volume of 0.00025 mm<sup>3</sup>.

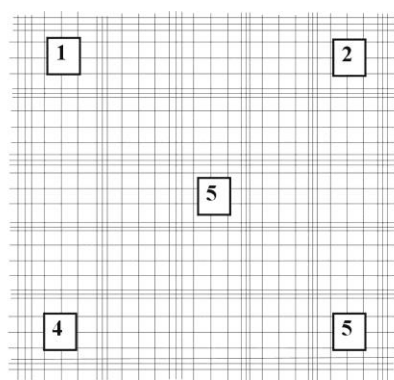
**Figure 5a.**

**Figure 5b.**

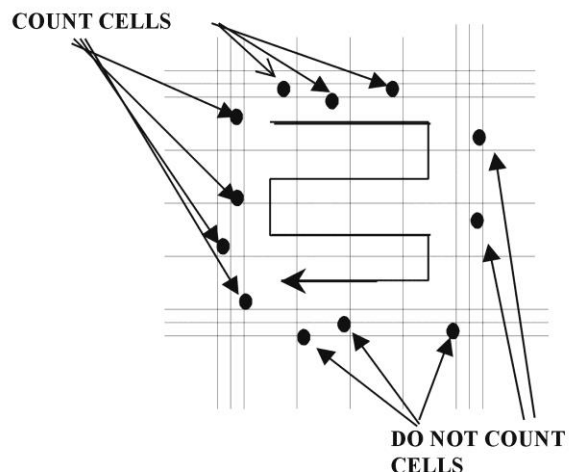


**COUNTING A HIGH-DENSITY CELL POPULATION.**

When counting high densities of cells squares use the 40x objective and count the four corner and one centre 0.04 mm<sup>2</sup> square (Figure 6a; below, left). When counting a 0.004 mm<sup>2</sup> square scan from the top left of one of 16 1/400 mm<sup>2</sup> squares and move to the bottom right as shown in Figure 6b, below right.



**SQUARE E**



Cells falling on the bordering triple lines should only be counted if they are on either the top or on the left lines only. Exclude those touching the bottom and the right hand side lines. When performing cell counting, the most accurate count is achieved when 120-200 cells can be counted. If you have more than this in the five squares then you should dilute your sample and re-count. If you have less than this you should use either the low density cell population method as described below or centrifuge and resuspend your cells in a smaller volume.

**Calculate the concentration of cells as below:**

The centre triple ruled grid has a volume of  $0.1 \text{ mm}^3$ . You have counted the cells in  $5/25$  of this grid, i.e. 5 out of the 25 squares. Thus to convert to the number of cells in  $0.1 \text{ mm}^3$  you have to divide by 5 and then multiply by 25. To convert this answer from cell/ $0.1 \text{ mm}^3$  to cells/ml you have to multiply by  $10^4$  ( $0.1 \text{ mm}^3 * 10^4 = 1000 \text{ mm}^3 = 1 \text{ ml}$ ).

Let no. of cell counted in 5 squares = X.

$$\text{no. of cells/ ml suspension} = \frac{X \times 25 \times 10^4}{5}$$

**NOTE: This does not take into account any dilutions made in preparation of the stain or any other dilutions prior to staining. You will have to calculate the effects of these for yourself.**

**COUNTING A LOW-DENSITY CELL POPULATION.**

In this case use 10x objective lens and count the squares ( $0.1 \text{ mm}^3$ ) in each corner of the 3\*3 grid, i.e. outside the triple ruled area, (labelled A, B, C and D in Figure 4 above). Divide the number of cells counted by 4 and multiply by  $10^4$  to get the number of cells per ml.

