

**INFLUÊNCIA DE DIFERENTES NÍVEIS DE METIONINA+CISTINA
SOBRE A PRODUÇÃO DE SÊMEN DE COELHOS
NOVA ZELÂNDIA BRANCO**

Claudio Scapinello*, Gentil Vanini de Moraes*, Maria Luiza Rodrigues de Souza*, Márcia Aparecida Andreazzi* e Elaine Bianospino Antunes*

RESUMO. O trabalho teve por objetivo estudar a influência de diferentes níveis de metionina+cistina nas rações sobre a produção e qualidade do sêmen de coelhos reprodutores da raça Nova Zelândia Branco. Foram utilizados 30 animais, distribuídos num delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições. Foi formulada uma dieta-referência com 12 % de proteína bruta e 0,30 % de metionina+cistina e suplementada com seis níveis de DL-metionina 99 % (0,0 %, 0,101 %, 0,202 %, 0,303 %, 0,404 % e 0,505 %), resultando em rações com 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 % e 0,8 % de metionina+cistina, respectivamente. Analisando 480 ejaculados, observou-se que o aumento nos níveis de metionina, nas rações, diminuiu linearmente o volume total de sêmen, o volume de sêmen sem a porção gelatinosa e o pH. Entretanto, não influenciou o aspecto, que variou de branco leitoso ao branco, a motilidade espermática progressiva, o vigor e a concentração dos espermatozoides, no sêmen. Foi observado, também, que o aspecto do sêmen foi mais aquoso e que a motilidade progressiva e o vigor dos espermatozoides foram piores durante os meses em que a temperatura ambiente se manteve mais elevada. Os resultados permitem concluir que o nível de 0,30 % de metionina+cistina mostrou-se suficiente para atender às exigências destes aminoácidos sulfurados, nas rações para coelhos reprodutores e que a temperatura ambiente elevada reduziu a qualidade do sêmen.

Palavras chave: coelhos reprodutores, metionina+cistina, sêmen.

* Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, Câmpus Universitário, 87020-900, Maringá-Paraná, Brasil.

Correspondência para Claudio Scapinello.

Data de recebimento: 01/07/97.

Data de aceite: 27/08/97.

THE INFLUENCE OF DIFFERENT METHIONINE + CYSTINE LEVELS ON NEW ZEALAND WHITE RABBIT SEMEN PRODUCTION

ABSTRACT. This experiment was carried out to study the influence of different methionine + cystine levels on diets designed to measure semen production and quality in New Zealand white rabbit males. A sample of 30 animals, distributed in a totally randomized design, was used with six treatments and five repetitions. A reference diet was formulated with 12.0% of crude protein and 0.3% of methionine + cystine and supplemented with six levels of DL-methionine 99% (0.0%, 0.101%, 0.202%, 0.303%, 0.404% and 0.505%), resulting in diets with 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7% and 0.8% of methionine + cystine respectively. The analysis of 480 ejaculations showed that the increase on the methionine levels in diets caused a linear reduction of the total semen volume, of the volume of semen without gel and of pH. On the other hand, it did not influence the semen aspect which changed from milky to white, nor the progressive motility and vigor nor the spermatozoa concentration in the semen. A more aqueous aspect of the semen and lower progressive motility and vigor were observed during the season in which room temperature remained higher. The results lead to the conclusion that the lowest methionine + cystine level studied (0.3%) was adequate to meet the requirements of sulphur amino acids in male rabbit diet and that semen quality decreased in hot season.

Key words: methionine + cystine, male rabbit, semen.

INTRODUÇÃO

A importância da qualidade da proteína na nutrição de coelhos tem sido reconhecida em estudos realizados, principalmente, nas duas últimas décadas, os quais demonstram a necessidade de um adequado suprimento de aminoácidos essenciais, para o normal desenvolvimento de coelhos. Entre os aminoácidos, a metionina é considerada a mais limitante em rações para coelhos em crescimento (De Blas, 1984).

Até o momento, a grande maioria dos trabalhos para obtenção de exigências nutricionais para coelhos foram conduzidos com animais em crescimento. A falta de pesquisas de exigências nutricionais, para animais em reprodução, tem como consequência a ausência de um plano de alimentação para matrizes e reprodutores que permitiria explorar mais racionalmente o potencial produtivo destes animais. As tabelas de exigências nutricionais, atualmente, ainda não trazem dados confiáveis de exigências nutricionais de reprodutores.

Portanto, no manejo de alimentação de reprodutores, é freqüente a formulação de rações de matrizes ou de animais em crescimento, com 0,60% de metionina+cistina, fornecidas em quantidades restritas com o intuito de controle do seu peso vivo (De Blas, 1984).

Por outro lado, muitos trabalhos já foram conduzidos para estudar as características do sêmen de coelhos reprodutores, embora na sua totalidade em outros países, especialmente na França e Itália, onde a inseminação artificial já é uma realidade na exploração de coelhos. Nesta situação de manejo reprodutivo, Rodrigues *et al* (1996) recomendam a realização de exames dos reprodutores antes de entrarem nos programas de reprodução.

Com o objetivo de avaliar a concentração de espermatozóides, no sêmen de coelhos, Battaglini *et al.* (1992) obtiveram, em média, 500 milhões de espermatozóides/ml. Castellini *et al.* (1996) citaram, como média, uma concentração de espermatozóides no sêmen de coelhos, de 430 milhões/ml.

Oshio (1986) observou que serviços diários de coelhos reprodutores durante um período de cinco dias, foram suficientes para diminuir linearmente o volume, a concentração e a motilidade de espermatozóides.

Bodnar *et al.* (1996), avaliando sêmen de reprodutores coletados uma vez a cada 3 dias ou uma vez diariamente, durante um período de 25 dias, obtiveram, respectivamente, valores de 0,79 e 0,54ml de volume, 4,00 e 3,19 numa escala de 1 a 5 pontos para motilidade, 286,00 e 231,66 milhões de espermatozóides/ml de sêmen e 78,6% e 73,20 % de espermatozóides (spz) vivos. Os autores observaram piora na qualidade do sêmen de reprodutores que tiveram coletas diárias.

Coletando sêmen de coelhos três vezes por semana, Bunaciu *et al.* (1996) obtiveram volume total de ejaculado (sêmen + gel) de 0,85 ml, volume de sêmen sem gel de 0,55 ml, motilidade progressiva de 85 %, concentração de spz de 223,8 milhões/ml, porcentagem de spz mortos de 16,4 % e porcentagem de spz anormais de 9,12 %.

Luzi *et al.* (1996), fornecendo duas rações, uma com 19,7 % de proteína bruta e 0,62% de metionina+cistina e outra com 14,51% de proteína bruta e 0,58% de metionina+cistina para coelhos reprodutores, não observaram diferenças nas características de sêmen dos animais alimentados com as duas rações. Os valores para volume, concentração de spz, motilidade (escala 1 a 5 pontos) e pH do sêmen dos animais que receberam ração com nível alto de proteína foram, respectivamente, de

1,13 ml, 482,8 milhões spz/ml, 3,51 e 7,30 e para os animais que receberam a ração com baixo nível de proteína foram, respectivamente, de 1,12 ml, 470,6 milhões spz/ml, 3,42 e 7,37.

Diante da existência de poucas pesquisas, relacionando níveis nutricionais e características do sêmen de coelhos, o presente trabalho teve por objetivo estudar a influência de diferentes níveis de metionina+cistina sobre a produção e qualidade do sêmen de coelhos da raça Nova Zelândia Branco.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, no período de junho de 1993 a janeiro de 1994.

Foram utilizados 30 reprodutores da raça Nova Zelândia Branco, aos seis meses de idade, alojados em gaiolas individuais de arame galvanizado medindo 40cm x 60cm x 45cm (comprimento, largura e altura), munidas de comedouro semi-automático e bebedouro automático, instaladas em um galpão de alvenaria com cobertura de fibroamianto, pé-direito de 3,5m, com 50cm da laterais em alvenaria e o restante em tela e cortina de aviário.

Os animais foram distribuídos num delineamento experimental inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições. Foi formulada uma ração-referência com 12,0 % de proteína bruta e 0,30 % de metionina+cistina, suplementada com seis níveis de DL-metionina 99 % (0,0 %, 0,101 %, 0,202 %, 0,303 %, 0,404 % e 0,505 %), resultando em rações com 0,3 %, 0,4 %, 0,5 %, 0,6 %, 0,7 % e 0,8 % de metionina+cistina. A DL-metionina foi introduzida nas rações em substituição ao amido (Tabela 1). Em seguida, todas as rações foram peletizadas a seco.

As rações e a água foram fornecidas, à vontade, durante o período experimental.

Os coelhos foram pesados no início do experimento e após, mensalmente, até o final do experimento.

Quinzenalmente, foram feitas coletas de sêmen dos animais utilizando-se vagina artificial feita de tubo plástico com 8 cm de comprimento e 4 cm de diâmetro, revestida, internamente, com preservativo não lubrificado, totalizando 480 coletas.

Tabela 1. Composições Percentual e Química das Rações Experimentais.

Ingredientes	Níveis de Metionina+Cistina (%)					
	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8
Milho	44,97	45,10	45,24	45,37	45,50	45,63
Farelo de soja	10,07	10,07	10,07	10,07	10,07	10,07
Feno de aveia	40,17	40,17	40,17	40,17	40,17	40,17
Amido	1,50	1,27	1,03	0,80	0,57	0,34
Sal comum	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40
Fosfato bicálcico	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Calcário	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Mistura Vit.+Min.*	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
L-Lisina HCL(78,5%)	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39	0,39
DL-Metionina 99%	-	0,101	0,202	0,303	0,404	0,505
Total	100	100	100	100	100	100
Composição Química calculada (com base na matéria natural)						
Proteína Bruta (%)	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0	12,0
Energia digest. (kcal/kg)	2500	2500	2500	2500	2500	2500
Fibra Bruta (%)	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00	13,00
Cálcio (%)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Fósforo (%)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Metionina+cistina (%)	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80

* NUVITAL COELHOS. Composição por kilograma do produto: Vit.A,300.000UI; Vit.D₃, 50.000UI; Vit.E, 4.000mg; Vit. K3, 100mg; Vit.B1, 200mg; Vit.B2, 300mg; Vit.B6, 100mg; Vit.B12, 1000mg; Ác. Nicot. 1.500mg; Ác. Pantot., 1000mg; Colina, 35.000mg; Ferro, 4.000mg; Cobre, 600mg; Cobalto, 100mg; Manganês, 4.300mg; Zinco, 6.000mg; Iodo, 32mg; Selênio, 8mg; Metionina, 60.000mg; Promotor de Crescimento, 1.500mg; Coccidiostático, 12.500mg; Antioxidante, 10.000mg.

A temperatura da água utilizada na vagina artificial, no momento da coleta, foi de 41°C. Para obtenção do sêmen foi utilizada uma fêmea em cio, a qual serviu como manequim.

O aspecto do sêmen (branco cremoso=1, branco leitoso =2, branco=3, branco aquoso=4 e aquoso=5) e o volume foram avaliados visualmente. O pH foi determinado com papel indicador de tornassol (Universal indicator pH 0-14, Merck).

A motilidade progressiva foi determinada utilizando-se uma gota de sêmen diluído em seis gotas de citrato de sódio a 3 % com pH 7,0 em microscópio de contraste de fase em 40X (Micronal CBA), seguindo uma escala de valores de zero a 100 %. Juntamente, foi avaliado o vigor numa escala de 0 a 5 pontos.

A concentração foi estimada utilizando-se hemocitômetro Neubauer (Germany improved dupla), em microscópio de contraste de fase (Micronal CBA), em 40X, contando-se, no mínimo, cinco quadrados

maiores da referida câmara, na diluição de 1:200.

Para realizar as análises de motilidade, vigor e concentração, o sêmen foi mantido em banho maria a 37°C.

O modelo estatístico utilizado para análise dos dados foi:

$$Y_{ijk} = b_0 + b_1 (M_i - M) + b_2 (M_i - M)^2 + A_j + M_i A_j + e_{ijk},$$

em que

Y_{ij} = característica do sêmen do animal k alocado no tratamento i e coletado no mês j ;

b_0 = constante geral;

b_1 = coeficiente de regressão linear da característica do sêmen do animal alocado no tratamento i e coletado no mês j ;

b_2 = coeficiente de regressão quadrático da característica do sêmen do animal alocado no tratamento i e coletado no mês j ;

M_i = efeito do nível de metionina+cistina i , sendo i = 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7% e 0,8%;

M = nível médio de metionina+cistina nas rações;

A_j = efeito do mês de coleta j sendo j = junho, julho, agosto, setembro, outubro, novembro, dezembro e janeiro;

e_{ijk} = erro aleatório associado a cada observação.

Para avaliar as diferenças referentes ao mês de coleta foi utilizado o teste Tukey ($P < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias de características quantitativas e qualitativas do sêmen de coelhos alimentados com rações contendo diferentes níveis de metionina+ cistina, encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Média de Produção de Sêmen e das Características Qualitativas e Quantitativas de Acordo com os Níveis de Metionina+Cistina nas rações

Características	Níveis de metionina+cistina (%)						Média	CV (%)
	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80		
Aspecto	3,42	3,36	3,04	3,50	3,55	3,19	3,34	19,23
Volume total (ml) ¹	1,34	1,21	1,13	1,16	1,15	0,84	1,14	27,17
Volume s/ Gel (ml) ²	1,13	1,04	0,97	0,91	1,04	0,67	0,96	27,59
pH	8,06	8,01	8,10	7,85	7,83	7,95	7,97	6,73
Motilidade Prog. (%)	59,0	75,5	52,9	64,3	57,8	68,9	63,1	40,53
Vigor	2,74	3,20	2,66	2,73	2,68	3,04	2,84	15,49
Concentração *	222,3	248,0	180,4	210,4	200,7	241,9	217,3	35,13

* Milhões de espermatozoides/ml.

1- Efeito linear dos níveis de metionina+cistina ($P<0,05$) $y = 1,13656 - 0,076018x$ $R^2 = 0,74$

2- Efeito linear dos níveis de metionina+cistina ($P<0,05$) $y = 0,96031 - 0,067661x$ $R^2 = 0,62$

3- Efeito linear dos níveis de metionina+cistina ($P<0,05$) $y = 7,96667 - 0,039286x$ $R^2 = 0,43$

Observou-se uma redução linear ($P<0,05$) do volume total e sem gelatina e no pH do sêmen de coelhos, à medida que aumentaram os níveis de metionina+cistina nas rações. Por outro lado, não foram observadas diferenças ($P>0,05$) sobre o aspecto do sêmen, a motilidade progressiva, o vigor e a concentração dos espermatozoides com o aumento dos níveis de metionina+cistina nas rações, embora, numericamente, a motilidade progressiva tenha aumentado à medida que se incrementou o teor de metionina+cistina na ração.

Possivelmente, o excesso de aminoácidos sulfurados para esta classe de animais esteja provocando desbalanceamento no *pool* de aminoácidos no sangue, o que causaria prejuízos no metabolismo protéico ligado à espermatogênese.

Utilizando rações com níveis de proteína bruta de 14,51 % e 19,7% e de metionina+cistina de 0,58 % e 0,62 %, respectivamente, Luzi *et al.* (1996) não observaram diferença sobre a concentração de espermatozoides, motilidade progressiva e o pH do sêmen de coelhos. Os resultados desses autores confirmam que as exigências protéicas desses animais, como observado neste experimento, não são elevadas.

Bodnar *et al.* (1996), ao analisarem a concentração de espermatozoides e motilidade progressiva também obtiveram resultados semelhantes ao deste estudo. Embora a motilidade progressiva dos espermatozoides tenha sido mais elevada do que aquela obtida neste experimento, Bunaciu *et al.* (1996) também observaram resultados semelhantes, na concentração de espermatozoides de coelhos reprodutores.

Com relação ao aspecto do sêmen, os valores da escala, obtidos neste experimento, equivalem à coloração entre o branco leitoso e branco, o que representa normalidade e demonstra boa qualidade do sêmen, haja vista que, à medida que o aspecto se apresenta mais aquoso, normalmente, a concentração de espermatozóides é mais baixa.

As médias de produção de sêmen e as suas características qualitativas, de acordo com os meses do ano em que as coletas foram realizadas, encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Média de Produção de Sêmen e das Características Qualitativas de Acordo com os Meses de Coleta

Características	Meses do Ano								CV (%)
	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	
Aspecto	3,70cd	2,87a	2,87a	3,13b	3,27bc	3,53bc	3,58bc	3,80cd	19,23
Volume total (ml)	0,93	1,41	1,04	1,28	1,19	1,08	1,00	1,16	27,17
Volume s/ gel (ml)	0,92	1,25	0,82	0,86	0,99	0,91	0,92	1,02	27,59
pH	7,97	8,10	8,10	7,93	7,92	7,97	7,95	7,83	6,73
Motilidade prog.(%)	76,7a	68,2b	72,0a	63,2b	64,3b	55,0bc	49,8c	55,7bc	40,53
Vigor	3,13a	2,90a	3,43a	3,33a	2,85a	2,37b	2,30b	2,40b	15,49
Concentração *	251,5	203,2	243,7	224,0	210,3	205,2	192,5	208,0	35,13

* milhões de espermatozóides/ml.

1- Médias seguidas de letras diferentes, na linha, diferem pelo teste tukey ($P < 0,05$).

Foi observado uma piora na qualidade do sêmen, representada pelos valores do aspecto, que, quanto mais elevado mais aquoso se apresenta o sêmen, pela diminuição da motilidade progressiva e pelo vigor dos espermatozóides, à medida que as coletas foram sendo realizadas nos meses de temperatura mais elevadas. Esta observação está de acordo com Leonard *et al.* (1980) que citaram efeitos adversos da temperatura sobre a qualidade do sêmen de coelhos.

Os meses em que a coleta foi realizada, no entanto, não afetaram o volume de sêmen, o pH e a concentração de espermatozóides/ml de sêmen.

CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que o nível mais baixo de metionina+cistina estudado (0,30%) foi suficiente para atender às exigências desses aminoácidos sulfurados para coelhos reprodutores.

O aumento da temperatura, nos meses de verão, reduziu a qualidade do sêmen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BATTAGLINI, M., CASTELLINI, C. & LATTAIOLI, P. Variability of the main characteristics of rabbit semen. *J. Appl. Rabb. Res.* 15(5):439-446, 1992.
- BODNAR, K., TOROK, I., HEJEL, P. & BODNAR, E. Preliminary study on the effect of ejaculation frequency on some characteristics of rabbit semen. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 6, 1996, Toulouse. *Proceedings...* Toulouse, 1996. p.41-44. v.2.
- BUNACIU, P., CIMPEANU, I. & BUNACIU, M. Mating frequency effect on spermatogenesis and performance of breeding rabbits. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 6, 1996, Toulouse. *Proceedings...* Toulouse, 1996. p.51-44. v.2.
- CASTELLINI, C., BIZZARRI, A. R. & CANNISTRARO, S. Water volume of rabbit spermatozoa measured by electron paramagnetic resonance at different temperatures. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 6, 1996, Toulouse. *Proceedings...* Toulouse, 1996. p.55-58. v.2.
- De BLAS, C. *Alimentation del conejo*. Madri: Mundi-Prensa, 1984, 215p.
- LLEONARD, F., CAMPOS, J.L., VALLS, R., CASTELLO, J.R., COSTA, P. & PONTES, M. *Tratado de Cunicultura*. Barcelona: Real Escuela Oficial y Superior de Avicultura, 1980. 413p. v.1.
- LUZI, F., MAERTENS, L., MIJTEN, P. & PIZZI, F. Effect of feeding level and dietary protein content on libido and semen characteristics of bucks. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 6, 1996, Toulouse. *Proceedings...* Toulouse, 1996. p.87-92. v.2.
- OSHIO, S. Characterisation of rabbit sperm by equilibrium sedimentation in percoll during frequent ejaculation. *Arch. Androl.*, 17(3):189-194, 1986.
- RODRIGUES, R., DENIS, R. & MILANES, C. Spermatic evaluation of males young for the incorporation to rabbit reproduction. In: WORLD RABBIT CONGRESS, 6, 1996, Toulouse. *Proceedings...* Toulouse, 1996. p.119-121. v.2.