

Documentos 147

Morfometria da Cabeça Espermática em Touro Nelore Submetidos a Deficiência de Zinco na Dieta

Paula de Almeida Barbosa Miranda
Carlos Eurico dos Santos Fernandes
Sheila da Silva Moraes
Alexandra Rocha de Oliveira
Simone da Cunha Pereira Lopes
Thaís Basso Amaral

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte

Rodovia BR 262 Km 4, CEP 79002-970 Campo Grande, MS

Caixa Postal 154

Fone: (67) 368 2064

Fax: (67) 368 2180

<http://www.cnpqc.embrapa.br>

E-mail: sac@cnpqc.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Ivo Martins Cezar*

Secretário-Executivo: *Mariana de Aragão Pereira*

Membros: *Antonio do Nascimento Rosa, Arnildo Pott, Cacilda Borges do Valle, Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima, Lúcia Gatto, Maria Antonia Martins de Ulhôa Cintra, Mariana de Aragão Pereira, Rodiney de Arruda Mauro, Tênisson Waldow de Souza*

Supervisor editorial: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

Revisor de texto: *Lúcia Helena Paula do Canto*

Normalização bibliográfica: *Maria Antonia M. de Ulhôa Cintra*

Fotos da capa: *Josimar Lima do Nascimento*

Capa: *Paulo Roberto Duarte Paes*

Editoração eletrônica: *Ecila Carolina Nunes Zampieri Lima*

1ª edição

1ª impressão (2004): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.

Embrapa Gado de Corte.

Morfometria da cabeça espermática em touros Nelore submetidos a deficiência de zinco na dieta / Paula de Almeida Barbosa Miranda... [et al.]. -- Campo Grande : Embrapa Gado de Corte, 2004.

28 p. ; 21 cm. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517-3747 ; 147)

ISBN 85-297-0183-6

1. Bovino. 2. Touro. 3. Nelore. 4. Reprodução. 5. Morfologia. 6. Sêmen. 7. Zinco. I. Miranda, Paula de Almeida Barbosa. II. Fernandes, Carlos Eurico dos Santos. III. Moraes, Sheila da Silva. IV. Oliveira, Alexandra Rocha de. V. Lopes, Simone da Cunha Pereira. VI. Amaral, Thaís Basso. VII. Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS). VIII. Título. IX. Série.

CDD 571.845 (21. ed.)

© Embrapa 2004

Autores

Paula de Almeida Barbosa Miranda

Médica-Veterinária, Bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, 79002-970 Campo Grande, MS.

Carlos Eurico dos Santos Fernandes

Médico-Veterinário, M.Sc., Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Av. Senador Filinto Müller, 244, Caixa Postal 549, 79070-900 Campo Grande, MS.

Sheila da Silva Moraes

Médica-Veterinária, Ph.D., CRMV-MS Nº 1.038, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, 79002-970 Campo Grande, MS. Correio eletrônico: sheila@cnpqc.embrapa.br

Alexandra Rocha de Oliveira

Zootecnista, Bolsista de Apoio Técnico do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, 79002-970 Campo Grande, MS.

Simone da Cunha Pereira Lopes

Bióloga, Bolsista de Apoio Técnico do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, 79002-970 Campo Grande, MS.

Thaís Basso Amaral

Médica-Veterinária, M.Sc., CRMV-MS Nº 1.713, Embrapa Gado de Corte, Rodovia BR 262, Km 4, Caixa Postal 154, 79002-970 Campo Grande, MS. Correio eletrônico: thais@cnpgc.embrapa.br

Sumário

Resumo	7
Abstract	9
Introdução	10
Material e Métodos	14
Animais	14
Exame de sêmen e nível de zinco na circulação sangüínea	14
Metodologia de Fuelgen	15
Morfometria da cabeça espermática	15
Análise Estatística	16
Experimento 1	16
Experimento 2	17
Resultados	18
Discussão	22
Conclusões	24
Referências Bibliográficas	25

Morfometria da Cabeça Espermática em Touro Nelore Submetidos a Deficiência de Zinco na Dieta

*Paula de Almeida Barbosa Miranda
Carlos Eurico dos Santos Fernandes
Sheila da Silva Moraes
Alexandra Rocha de Oliveira
Simone da Cunha Pereira Lopes
Thaís Basso Amaral*

Resumo

Touros jovens da raça Nelore (n = 6) foram mantidos em pasto formado de *Brachiaria brizantha* desde a desmama em dietas com diferentes níveis de zinco. Foram formados aleatoriamente dois grupos que receberam diariamente, durante dois anos, diferentes concentrações de zinco no sal mineral: T1 (n = 4), os animais não receberam suplemento com zinco e T2 (n = 2), 60 mg/kg/dia de Zn inorgânico suplementar. A concentração de Zn na pastagem variou de 17,8 (águas) a 12,8 mg/kg (seca), respectivamente. A partir dos 14 meses de idade, os animais foram submetidos quinzenalmente a exame de sêmen e colheita de sangue. A morfologia espermática foi estimada, incluindo a mensuração da cabeça espermática a partir de esfregaços coradas pelo método de Fuelgen, em imagens captadas digitalmente e processadas pelo software Kontron Elektronik Imaging System, KS 400-2.0. A concentração de zinco no plasma foi dosada por espectrofotometria de absorção atômica. Os resultados mostraram que os touros do T1 tiveram qualidade seminal inferior ($P < 0,05$) em relação ao T2. Observou-se variação das características seminais em função da data da colheita, evidenciando efeito estacional sobre a qualidade do sêmen. Os defeitos mais encontrados foram de peça intermediária e cauda. A concentração de Zinco (Zn) na circulação sangüínea foi maior ($P < 0,01$) no T1 em comparação ao T2 ($0,72 \pm 0,01$ x $0,66 \pm 0,01$, respectivamente). A área da cabeça espermática de espermatozóides morfolologicamente normais e com defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda foi maior ($P < 0,01$) para os touros do T1 em relação aos do T2. Ademais, espermatozóides com fragmentação nuclear apresentaram forma

mais alongada quando comparados àqueles sem alterações morfológicas. As correlações encontradas sugerem a importância do Zn na qualidade seminal, especialmente pelos efeitos deletérios que sua deficiência (subclínica) causa na morfologia espermática.

Termos para indexação: morfometria, cabeça espermática, touros jovens, zinco.

Morphometry of Spermatic Head in Nelore Young Bulls under Zinc Defficient Diet

Abstract

Young Nelore bulls (n = 6) were maintained in Brachiaria brizantha pasture on diets with different zinc levels since weaning. Two groups were randomized and received, daily and for two years, two levels of zinc on supplement: T1 (n = 4) no zinc on supplement and T2 (n = 2) 60 mg/Kg of inorganic zinc supplement. Pasture Zn concentration was 17,8 in wet and 12,8 mg/kg in dry season, respectively. From 14 months of age, animals were submitted to semen exam and blood collection. Spermatic morphology was estimated including the measurement of spermatic head from images captured digitally and processed by the software Kontron Eletronik Imaging System, KS 400-2.0. Zinc concentration in plasma was obtained by AAS methods. Results showed that T1 bulls had inferior seminal quality ($P < 0,05$), when compared to T2 bulls. A variation of seminal characteristics was observed in relation of the day of collection, showing a sazonal effect on semen quality. The most found defects were head defects and intermediate piece defects. Zinc concentration in plasma was higher ($P < 0,01$) on T1 group, when compared to T2 ($0,72 \pm 0,01 \times 0,66 \pm 0,01$, respectively). The area of spermatic heads of morphologic normal spermatozoids but with head defects, intermediate piece defects and tail defects was higher ($P < 0,01$) in T1 bulls than in T2 bulls. Furthermore, spermatozoids with nuclear fragmentation showed more elongated form when compared with those without morphologic alterations. Correlations found suggests the importance of zinc on seminal quality, especially by the delete effects its sub clinical deficiency causes on spermatic morphology.

Index terms: morphometry, spermatic head, young bulls, zinc.

Introdução

A eficiência dos sistemas produtivos em gado de corte está diretamente associada ao manejo reprodutivo e nutricional. No Brasil, onde a pecuária caracteriza-se basicamente por criações extensivas, a interação desses fatores (nutrição/reprodução) é um desafio constante no sentido de estabelecer metodologias direcionadas ao aumento da produtividade.

O perfil dos minerais nas principais forrageiras utilizadas na produção bovina, vem sendo estudado nos últimos anos nas regiões de clima tropical, vegetação de cerrado e solos de baixa fertilidade, típicas do centro-oeste brasileiro. Dentre estes, o zinco (Zn) tem recebido atenção especial devido ao seu baixo nível encontrado na maioria das amostras investigadas (Moraes, 2001), como também a sua importância na multiplicação celular que afeta o crescimento, sistema imunológico e reprodução do animal (Graham, 1991). Com esse pano de fundo, estudos foram delineados com o objetivo de identificar os efeitos de dietas deficientes em zinco sobre a função reprodutiva de fêmeas em regime extensivo e, especialmente, sobre a função imunológica e espermatogênese de seus filhos (Moraes, et al. 2001; Fernandes et al., 2003; Oliveira et al., 2004).

No macho, a deficiência de Zn está ligada ao atraso no crescimento testicular com atrofia do epitélio tubular, além de prejudicar a produção do hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo estimulante (FSH), testosterona e inibir a espermatogênese (Hidiroglou e Knipfel, 1984; Salgueiro et al., 2000). Segundo Allen et al. (1983), o conteúdo de Zn é alto nos testículos de animais adultos, sendo que a maior concentração deste mineral encontra-se na próstata. Porém, deficiências marginais de Zn nem sempre acarretam distúrbios metabólicos clinicamente diagnosticáveis. Embora possam ocasionar a diminuição na qualidade do sêmen, podem passar despercebidas. Nestes casos, as concentrações sanguíneas de Zn dificilmente se reduzem devido ao complexo mecanismo homeostático envolvido em sua absorção e metabolismo. Além disso, o nível de Zn circulante é influenciado pela composição da dieta e pela interação com outros elementos como o cobre, ferro, cálcio e cádmio (Kendall et al, 2000). Em ratos, durante o primeiro mês de vida, a concentração testicular de Zn se mantém constante (20 $\mu\text{g/g}$ de peso seco testicular) e após o segundo mês, estes níveis aumentam consideravelmente (Bedwal & Bahuguna, 1994). Este aumento coincide com o período de transformação das espermátides em espermatozóide, e pode ser devido à demanda aumentada para a formação intracelular de comple-

xos de proteína e Zn, incluindo algumas enzimas que se combinam com o Zn no espermatozóide. Na deficiência de Zn, a atividade da ribonuclease aumenta significativamente, acompanhada de decréscimo na concentração de RNA, DNA e proteína testiculares (Underwood & Somers, 1969).

A participação efetiva do Zn na estrutura e organização da cromatina espermática nos bovinos ainda não está totalmente compreendida. De modo geral, a estrutura nuclear de espermatogônias e espermátócitos primários é similar à observada em células somáticas, porém, a partir da metade até o final da espermiogênese, o núcleo das espermátides sofre transformações através de dois processos distintos. O primeiro envolve a reconfiguração da matriz nuclear, durante a metade da espermiogênese, quando o núcleo das espermátides passa de esférico a alongado, característico para cada espécie. Existem evidências de que proteínas da matriz nuclear sejam a responsável pelas mudanças na forma nuclear. Quando proteínas nucleares foram removidas do DNA espermático, a matriz nuclear manteve a forma similar à de um núcleo intacto (Ostermeier et al., 2000) e, espermatozoides com alterações na distribuição de proteínas da matriz nuclear possuem formato anormal. Alguns estudiosos relatam que um nível insuficiente de zinco no núcleo pode desestabilizar a estrutura quaternária da cromatina, reduzir o conteúdo de DNA do espermatozóide e, por meio disto, reduzir sua capacidade de fertilização (Kvist, 1982; Kvist et al., 1985 a,b; Kvist et al., 1987).

O outro processo relacionado à transformação do núcleo das espermátides é a substituição das histonas por “proteínas de transição” e, posteriormente por protaminas espermáticas, responsáveis pela compactação da cromatina espermática (Ostermeier et al., 2000; Fuentes-Mascorro et al., 2000). As protaminas de mamíferos são ricas em resíduos de arginina e cisteína e formam pontes dissulfídicas (S-S) dentro e entre moléculas adjacentes. O espermatozóide bovino maduro contém apenas a protamina-1, que forma tipicamente, duas pontes S-S intramoleculares e três pontes intermoleculares (Balhorn, 1982; Mazrimas et al., 1986).

Durante a espermiogênese, o Zn liga-se aos grupamentos sulfídricos das cisteínas e desta forma, auxilia a compactação das protaminas e as protege da oxidação. A expressão de genes da família *Zfp-29* possibilita este mecanismo, uma vez que determina a transcrição de uma proteína de 68,7 kDa associada à regulação da capacidade de compactação e condensação da cromatina

espermática (Denny & Ashworth, 1991). Não obstante, níveis insuficientes de Zn no núcleo podem levar à desestabilização da cromatina, reduzindo o conteúdo de DNA do espermatozóide e, conseqüentemente, diminuindo sua capacidade fecundante (Bedwal & Bahuguna, 1994). Assim, é possível que alterações na seqüência destes eventos, especialmente no metabolismo do Zn, cause anormalidades diretas no DNA, na organização da cromatina ou na matriz nuclear, podendo acarretar alterações na morfologia nuclear espermática. Além disso, como se faz necessário que a cromatina e a matriz nuclear estejam íntegras para que ocorra o desenvolvimento adequado do embrião, a avaliação da forma nuclear espermática pode ser útil na determinação da fertilidade do macho (Ostermeier et al., 2000).

Outro aspecto importante que tem sido investigado é a presença da função reguladora do Zn na atividade bioquímica espermática no ambiente epididimal. Embora a organização estrutural da região da peça intermediária e cauda ocorra nos túbulos seminíferos, é na cabeça, corpo e cauda do epidídimo que estas estruturas atingem plena função bioquímica (Amman et al., 1993). A peça intermediária é formada por um feixe mitocondrial de forma helicoidal que cobre o axonema, constituído por nove grupamentos de fibras densas externas (com função ATPase) sobre dois pares de túbulos centrais (Amelar et al., 1980). Íons de Zn estão predominantemente localizados nas fibras densas externas e sua função primordial é prevenir a oxidação dos grupamentos dissulfídricos (Calvin et al., 1973). A medida que os espermatozóides avançam no epidídimo, especialmente na cauda e após ejaculação, o conteúdo de Zn reduz-se em mais de 60%. Isto ocasiona uma maior estabilização das fibras densas externas a partir da oxidação dos grupamentos dissulfídricos, resultando em energia e motilidade progressiva (Henkel et al., 1999). Portanto, a redução do conteúdo de Zn na peça intermediária favorece a atividade móvel e capacidade energética da célula espermática.

Atualmente, para avaliar a qualidade seminal são utilizados parâmetros que incluem a percentagem de espermatozóides móveis, vigor e morfologia espermática. Não obstante, alguns parâmetros utilizados não são capazes de identificar touros com fertilidade reduzida além de ter baixas repetibilidade e sensibilidade (Amann & Hammerstedt, 1993). Outros métodos, baseados na análise de imagem (AI), têm sido utilizados com o intuito de aumentar a sensibilidade, bem como reduzir a subjetividade das análises morfológicas. Muitos pesquisadores utilizaram AI para mensurar área, perímetro, comprimento, largura

e, baseados nestas, obter medidas da cabeça e núcleo do espermatozóide. Este método tem sido utilizado com sucesso na análise de sêmen humano (Boersma et al., 2001) e tem sido discutido em bovinos (Foote, 2003).

Uma vez que a morfologia da cabeça espermática tem grande importância na fertilização e liberação do material genético para o ovócito, medidas simples e objetivas como o tamanho e o formato podem ser usados na avaliação da fertilidade em machos. Diferenças substanciais de tamanho da cabeça espermática foram relatadas entre espécies. Este fato pode ser devido, em parte, a variações biológicas uma vez que há grandes diferenças interespecíficas entre machos férteis (Ostermeier et al., 2001). No entanto, variações no tamanho, forma da cabeça e conteúdo de DNA estão associados a subfertilidade e infertilidade (Auger & Dadoune, 1993).

A área total da cabeça tem sido obtida por vários métodos (Foote, 2003). Van Duijn (1960), desenvolveu uma fórmula usando medidas lineares de comprimento, largura e base, pelas quais a área da cabeça espermática pode ser calculada. Salisbury & van Dongen, (1963) utilizaram a fórmula proposta por Van Duijn (1960), projetaram o espermatozóide bovino em aumento de 5000x e encontraram correlação entre a área calculada pela fórmula e aquela determinada por planimetria. Outros métodos incluem medidas lineares obtidas diretamente por micrômetro ocular ou por fotografias.

Sailer et al. (1996), estudaram a relação entre espermatozóides morfológicamente anormais, estrutura da cromatina espermática e fertilidade, em 13 touros, através da reação de Fielgen e mensurações em imagens computadorizadas e concluíram que a morfometria é um bom parâmetro para avaliar a fertilidade e alterações na estrutura da cromatina. Da mesma forma, Barth & Oko (1989) utilizaram essa metodologia para confirmar a causa de redução da fertilidade em touros usados em programas de inseminação artificial. Sprenger & Coe (1995), compararam a habilidade de discernir defeitos de cabeça entre a coloração de Fielgen, microscopia de contraste de fase e eosina-nigrosina em microscopia de campo claro (método preconizado pela *American Theriogenology Society*). Neste estudo, a reação de Fielgen detectou maior número de anormalidades de cabeça e foi mais precisa na diferenciação dos padrões de anormalidades no DNA. Estes autores concluíram que tanto o contraste de fase quanto o método de Fielgen foram superiores aos métodos de rotina, especialmente quanto ao monitoramento das anormalidades espermáticas.

Os objetivos do presente estudo foram comparar o espermograma de touros com e sem inclusão de Zn na suplementação mineral durante o período de um ano, determinar a concentração de Zn circulante em ambos os grupos, comparar as concentrações de Zn circulante com as diferentes características seminais e estabelecer padrões morfométricos a partir da análise computadorizada.

Material e Métodos

Animais

Bezerros Nelore ($n = 6$) foram desmamados com idade entre 7 e 8 meses e mantidos em regime extensivo, em pastagem de *Brachiaria brizantha*, na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 tratamentos e receberam diariamente, durante dois anos, duas concentrações de Zinco misturado ao sal mineral, como segue: tratamento 1 (T1, $n = 4$), os animais não receberam Zinco e o tratamento 2 (T2, $n = 2$, controle), 60mg/kg/dia de Zn inorgânico. A partir dos 14 meses de idade, os tourinhos foram submetidos a exame andrológico e colheita de sangue quinzenalmente para monitoramento da qualidade seminal e determinação das concentrações de Zn na circulação. O período experimental foi de dois anos com quatro avaliações nutricionais das pastagens. A avaliação do consumo do sal mineral foi semanal. O consumo médio do sal mineral, no período seco foi de 57,4 g/UA no T1 e de 39,3g/UA no T2; no período chuvoso foi de 95,1 g/UA para o T1 e 52,2 g/UA para o T2. A concentração média de zinco no pasto do T1 variou de 13,1 (seca) a 17,8 mg/kg (chuva) e no pasto do T2 variou de 12,8 (seca) a 16,7 mg/kg (chuva) na matéria seca, respectivamente. Dessa forma a média anual estimada de zinco na matéria seca da dieta do T1 foi de 15,45 e do T2 de 57,3 mg/kg, respectivamente.

Exame de sêmen e nível de zinco na circulação sangüínea

O sêmen foi colhido por eletro-ejaculação sendo que imediatamente após estimou-se a motilidade (%) e vigor (0-5), em lâmina e lamínula sob microscopia de campo claro. Amostras foram diluídas em formol-salino tamponado 1% e foram avaliadas posteriormente para morfologia espermática em microscopia de contraste de fase (preparações úmidas, 1000x) onde era determinado o percentual em 100 células/lâmina de espermatozóides morfologicamente normais, defeitos de cabeça (piriforme, cratera, subdesenvolvido, contorno irregular, micro e macrocefálico), acrossomo (granular, vesiculoso, destacado e dobrado),

peça intermediária (fraturada, dobrada, hipoplásica, engrossada e desnuda), gota citoplasmática proximal, cauda (fortemente dobrada e retro-axial), cabeça destacada (contorno e forma normais), segundo Barth e Oko (1989). Para fins de análise, considerou-se esfregaços mensais de cada touro de ambos tratamentos, no período de fevereiro de 2003 a fevereiro de 2004.

Para a determinação do Zn circulante, amostras (1,0 mL) de sangue (soro) foram colhidas por punção jugular, em frascos estéreis (Nalgene) com heparina e centrifugadas a 3.000 rpm durante 20 minutos para separação do plasma. Posteriormente, foram diluídas em 4 mL de água deionizada e procedeu-se a leitura da concentração de Zn (mg/mL) em espectrofotômetro de absorção atômica marca Perkin-Elmer, modelo 2380, em comprimento de onda de 213,7 nm.

Metodologia de Fuelgen

A estimativa da fragmentação nuclear baseou-se na metodologia de Fuelgen, segundo Barth e Oko (1989) com modificações. Após realizar o esfregaço, as lâminas foram embebidas em solução de ácido clorídrico 5N por 30 minutos e em seguida, após rápida lavagem com água destilada, mergulhadas em reativo de Schiff 5N por trinta minutos. Posteriormente, foram lavadas em água corrente por cinco minutos e após secar, mergulhadas em solução de ácido periódico de Schiff (PAS) a 0,8% por trinta minutos. Em seguida, as lâminas foram novamente lavadas em água corrente e secas em ambiente laboratorial. A leitura foi feita em microscopia de contraste de fase em imersão (1000x), estimando-se em 200 espermatozoides o percentual de formas com fragmentação nuclear, ou seja, aquelas que apresentavam a formação de vacúolos, descoradas (tipo “fantasma”) ou com halos claros na região nuclear (Fig. 1).

Morfometria da cabeça espermática

Para as análises morfométricas utilizaram-se esfregaços corados pelo método de Fuelgen avaliados em microscopia de contraste de fase, sob imersão. Considerou-se a mensuração de 30 células/lâmina, sendo seis com defeito de cabeça, seis com defeito de cauda, seis com defeito de peça intermediária, seis com fragmentação nuclear e seis células sem alterações morfológicas. Imagens de diversos campos foram captadas digitalmente e armazenadas no *software* Kontron Elektronik Imaging System, KS400-2.0 (GmbH), determinando-se o comprimento, largura superior (na região da maior medida) e largura inferior (na região da base espermática) em mm e área total em mm² pela equação: $\text{área} = [(largura\ superior\ (B) + largura\ inferior(C))/2] \times comprimento$, conforme a Fig. 2.

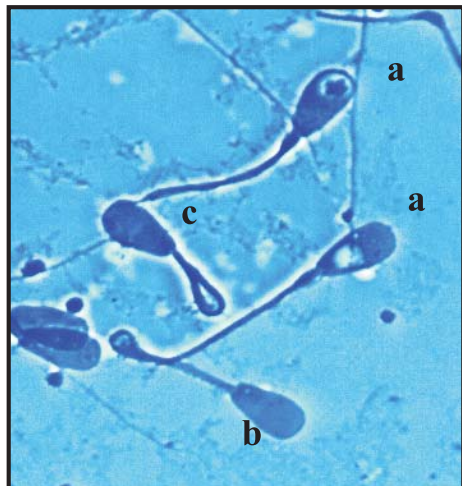
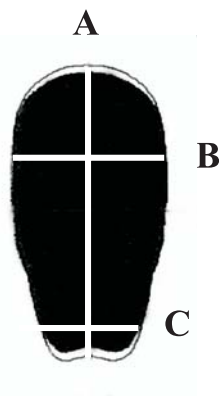


Fig. 1. Representação da fragmentação nuclear em espermatozoides bovinos corados pelo método de Fuelgen e avaliados em microscopia de contraste de fase (1.200 x): **a** – espermatozóide com alo nuclear, **b** – espermatozóide parcialmente descolorado (fantasma), **c** – espermatozóide com cauda fortemente dobrada, mas com núcleo íntegro.

Fig. 2. Representação das medidas obtidas da cabeça espermática: **A**, comprimento (μm), **B**, largura superior (μm) e **C**, largura inferior (μm).



Análise Estatística

Experimento 1

No primeiro experimento verificou-se o efeito da suplementação mineral com ou sem zinco (efeito de tratamento) com base na avaliação do espermograma estimado pela microscopia de contraste de fase. As médias para as diferentes características seminais foram ajustadas pela data da colheita (covariância), comparadas pelo teste de Duncan ($P < 0,05$), conforme o modelo que segue.

$$Y_i = m + T_i + \beta (X_{ij} - m) + e_{ij}$$

onde:

Y_i = observação referente ao ajuste do efeito principal do tratamento T_i (i = tratamento 1 e 2) e covariância;

m = média geral;

T_i = efeito da concentração de Zn na suplementação mineral para i tratamentos (i = 1 e 2);

β = coeficiente de regressão linear;

X_{ij} = co-variável (data da colheita) medida em T_i repetições, respectivamente;

e_{ij} = estimativa do erro experimental.

Após esta análise, foi estabelecida a correlação parcial entre concentração de Zn na circulação e características seminais para cada tratamento, determinada pelo método de Pearson ($P < 0,05$, ajustado para o mês da colheita).

Experimento 2

Neste experimento, utilizou-se o resultado das análises morfométricas obtidas pelo método de Fuelgen. Verificou-se o efeito principal da suplementação mineral com ou sem Zn, das características morfológicas atribuídas a cada célula e interação entre ambas, sobre as diferentes medidas da cabeça espermática, como segue:

$$Y_{ij} = m + T_i + C_j + T_i \times C_j + e_{ij}$$

onde:

Y_{ij} = observação referente ao efeito principal da concentração de Zn na suplementação mineral, da característica morfológica do espermatozóide e interação para ij repetições;

m = média geral;

T_i = efeito da concentração de Zn na suplementação mineral para i tratamentos (i = 1 e 2);

C_j = efeito principal da característica morfológica do espermatozóide (com fragmentação e sem fragmentação nuclear) das células para j repetições;

$T_i \times C_j$ = efeito da interação T e C para ij repetições, respectivamente;

e_{ij} = estimativa do erro experimental.

Para especificar o efeito da característica morfológica (normais x fragmentação nuclear) sobre as diferentes medidas atribuídas à cabeça espermática, utilizou-se um modelo aleatório, comparando as médias pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

Resultados

As médias ajustadas das características seminais e sua correlação com o nível de Zn sanguíneo estão descritas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Os touros sem Zn na suplementação mineral (T1) apresentam qualidade seminal inferior ($p < 0,05$) aos do grupo controle (T2, Tabela 1). Além disso, as características seminais estudadas variam significativamente em função da data da colheita, evidenciando o efeito estacional sobre a qualidade seminal. Dos defeitos encontrados, os de peça intermediária e de cauda foram os mais prevalentes, caracterizados pelos tipos "*dag defect*", "*bent tail*" e cauda fortemente dobrada ou enrolada (Fig. 3). A concentração sérica de Zn é superior ($p < 0,01$) nos animais do T1 em relação aos do T2.

Tabela 1. Efeito do mês da colheita e do nível de Zn no sal mineral sobre diferentes características seminais em touros Nelore.

<i>Características seminais</i>	<i>Mês da colheita</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>
Motilidade (%)	0,984 *	54,4 ±0,56 ^a	66,6 ±0,87 ^b
Vigor (1 a 5)	0,056 *	2,7 ±0,03 ^a	3,7 ±0,04 ^b
Morfologia (%)			
Normais	1,730 *	65,1 ±0,56 ^a	79,3 ±0,73 ^b
Defeito de cabeça	0,247 *	5,5 ±0,08 ^a	3,2 ±0,11 ^b
Defeito de acrossomo	0,071 *	1,9 ±0,05 ^a	1,3 ±0,09 ^b
Defeito de peça	-0,436 *	8,6 ±0,21 ^a	3,3 ±0,17 ^b
Gota citoplasmática	0,084 *	1,3 ±0,05 ^a	0,2 ±0,02 ^b
Defeito de cauda	-0,977 *	12,8 ±0,36 ^a	5,6 ±0,30 ^b
Cabeça Isolada Normal	-0,727 *	4,3 ±0,2 ^a	6,9 ±0,57 ^b
Zn (mg/mL)	0,015 *	0,72 ±0,01 ^a	0,66 ±0,01 ^b

^{a,b} letras diferentes entre colunas indicam efeito significativa entre tratamentos ($P < 0,01$, Duncan)

* efeito significativo ($P < 0,05$, covariância). T1 = 0 mg/kg/dia de Zn no sal mineral, T2 = 60 mg/kg/dia de Zn inorgânico no sal mineral.

Tabela 2. Coeficientes de correlação entre características seminais e concentração sérica de Zn (mg/mL) de acordo com o tratamento.

<i>Característica seminal</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>
Motilidade (%)	ns	0,19 **
Vigor (0-5)	ns	0,12 *
Morfologia (%)		
Normais	0,13 **	0,23 **
Defeitos de cabeça	-0,27 **	0,35 **
Defeitos de peça intermediária	-0,17 **	-0,18 **
Defeitos de acrossomo	ns	0,23 **
Gota citoplasmática proximal	-0,15 **	-0,22 **
Defeitos de cauda	ns	ns
Cabeça isolada normal	ns	-0,30 **

T1 = 0 mg/kg/dia de Zn no sal mineral, T2 = 60 mg/kg/dia de Zn inorgânico no sal mineral.

** $P < 0,01$; * $P < 0,05$

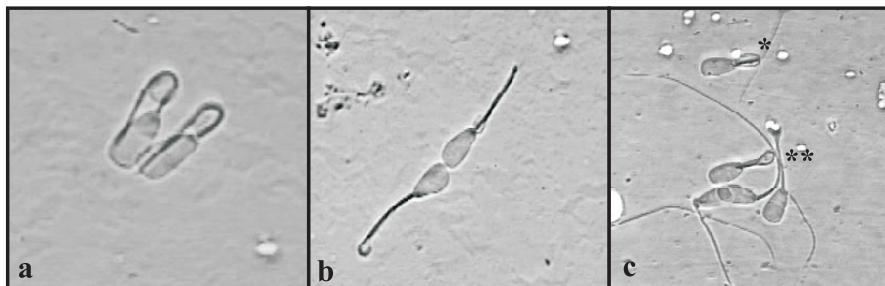


Fig. 3. Características morfológicas dos defeitos de peça intermediária do tipo “dag defect” (a e c*) e de cauda fortemente dobrada (b e c**). Imagens obtidas digitalmente em 1.200 x (a) e 1.000 x (b e c) em microscopia de contraste de fase.

Na Tabela 3 estão descritas as médias da área (μm^2) da cabeça espermática para os efeitos de tratamento e características morfológicas seminais dos tourinhos. Os animais do T1 apresentaram maior área da cabeça espermática ($P < 0,01$) para todas as características morfológicas em relação aos do T2. Além disso, observa-se que a área dos espermatozóides normais é maior ($P < 0,01$) em relação às demais características dentro de cada tratamento. Estes resultados podem indicar que espermatozóides com defeitos morfológicos tendem a ter a cabeça espermática menor em relação àqueles morfologicamente normais.

As médias do comprimento Largura inferior (μm) da cabeça espermática para os efeitos de tratamento e características morfológicas estão demonstradas na Tabela 3. Os valores do T1 foram superiores ($P < 0,01$) aos do T2. Além disso, dentro do T2, os espermatozóides com defeitos de cabeça, cauda e peça intermediária apresentaram menor ($P < 0,01$) comprimento da cabeça espermática em relação aos normais. Para a largura superior da cabeça espermática não houve diferença significativa apenas para os espermatozóides normais entre tratamentos, pois no T1, a largura superior foi maior para os defeitos de cabeça, cauda e peça intermediária. O efeito significativo da característica morfológica foi mais importante dentro de cada tratamento, uma vez que os normais apresentaram maior largura superior (Tabela 3).

Tabela 3. Médias da área (μm^2), comprimento de cabeça (μm), largura superior (μm), largura inferior (μm) da cabeça espermática para os efeitos de tratamento e características morfológicas seminais em touros Nelore.

<i>Medida</i>	<i>Características seminais</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>
Área (μm^2)	Normal	31,8 $\pm$ 0,26 ^{aA}	28,5 $\pm$ 0,37 ^{bA}
	Defeito de cabeça	29,8 $\pm$ 0,26 ^{aB}	25,5 $\pm$ 0,37 ^{bB}
	Defeito de cauda	30,8 $\pm$ 0,26 ^{aBC}	26,7 $\pm$ 0,37 ^{bBC}
	Defeito de PI	30,4 $\pm$ 0,27 ^{aBC}	26,3 $\pm$ 0,41 ^{bBC}
Comprimento de cabeça (μm)	Normal	8,6 $\pm$ 0,04 ^{aA}	8,2 $\pm$ 0,06 ^{bA}
	Defeito de cabeça	8,6 $\pm$ 0,04 ^{aA}	8,1 $\pm$ 0,06 ^{bAB}
	Defeito de cauda	8,5 $\pm$ 0,04 ^{aA}	7,9 $\pm$ 0,06 ^{bB}
	Defeito de PI	8,6 $\pm$ 0,05 ^{aA}	7,9 $\pm$ 0,07 ^{bB}
Largura superior (μm)	Normal	4,5 $\pm$ 0,03 ^{aA}	4,5 $\pm$ 0,04 ^{aA}
	Defeito de cabeça	4,5 $\pm$ 0,03 ^{aB}	4,3 $\pm$ 0,04 ^{bB}
	Defeito de cauda	4,5 $\pm$ 0,02 ^{aAB}	4,3 $\pm$ 0,04 ^{bBC}
	Defeito de PI	4,5 $\pm$ 0,03 ^{aAB}	4,2 $\pm$ 0,04 ^{bBC}
Largura inferior (μm)	Normal	2,8 $\pm$ 0,03 ^{aA}	2,5 $\pm$ 0,04 ^{bA}
	Defeito de cabeça	2,4 $\pm$ 0,03 ^{aB}	1,9 $\pm$ 0,04 ^{bB}
	Defeito de cauda	2,7 $\pm$ 0,03 ^{aBC}	2,3 $\pm$ 0,04 ^{bBC}
	Defeito de PI	2,6 $\pm$ 0,03 ^{aBC}	2,3 $\pm$ 0,05 ^{bBC}

^{ab} Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa;

^{ABC} letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa.

T1 = 0 mg/kg/dia de Zn no sal mineral, T2 = 60 mg/kg/dia de Zn inorgânico no sal mineral.

As médias da largura inferior (mm) estão demonstradas na Tabela 3. No T1, todas as medidas da largura inferior foram significativamente maiores ($P < 0,01$), independentemente da característica morfológica. O defeito de cabeça apresentou os menores valores de largura inferior nos tratamentos T1 e T2. Nos touros do T1, as medidas estimadas para essa característica sugerem a predominância de formas mais retas na base ($2,4 \pm 0,03$), enquanto para o T2 foi observado um estreitamento ($1,9 \pm 0,04$).

A Tabela 4 apresenta a comparação entre espermatozóides com fragmentação nuclear e morfolologicamente normais para as diferentes medidas da cabeça espermática. Espermatozóides normais apresentaram valores de área, comprimento e largura inferior menores ($P < 0,01$), e largura superior maior do que aqueles com fragmentação nuclear. Isto indica que as células com alterações na cromatina ou com fragmentação na região nuclear apresentaram características mais alongadas em relação às consideradas normais.

Tabela 4. Comparação entre espermatozóides morfológicamente normais e com fragmentação nuclear para diferentes medidas da cabeça espermática em touros Nelore.

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ($P < 0,01$; Duncan).

* área = μm^2 ; comprimento, largura superior e largura inferior = μm .

Discussão

Embora os aspectos que envolvam o Zn e sua função geral no organismo sejam amplamente estudados, estudos relacionando suas concentrações séricas com as características seminais em touros jovens não têm sido descritos. Neste experimento, buscou-se além de caracterizar o nível sérico de Zn em indivíduos com e sem suplementação na dieta, associá-lo à qualidade seminal, bem como o seu efeito direto sobre a morfologia da cabeça espermática como um possível indicador de redução do potencial reprodutivo.

A ausência de Zn na suplementação mineral do T1 e manutenção dos animais apenas com a forrageiras (*Brachiaria brizantha*) promoveram um quadro seminal de baixa qualidade, suficiente para descarte dos animais em programas reprodutivos. Na magnitude dos defeitos espermáticos encontrados, os de peça intermediária ($8,6\% \pm 0,21$) e de cauda ($12,8\% \pm 0,36$, na Tabela 1) foram os mais relevantes, caracterizados pelo tipo “*dag defect*”, “*bent tail*” e cauda fortemente dobrada (Figura 3). Esses defeitos morfológicos, mesmo que expliquem parte da variância do espermograma entre touros aptos e não aptos, tipicamente apresentam baixos percentuais no exame de sêmen (Fernandes et al., 2003). Porém, tais defeitos afetam a motilidade espermática e podem refletir profundas alterações no alinhamento, condensação e organização final dos feixes mitocondriais.

Além disso, é possível que o ambiente epididimal também esteja associado à prevalência desses defeitos (Barth & Oko, 1989). Segundo Henkel et al. (1999),

a presença de altos níveis de Zn na cauda do epidídimo poderia comprometer a capacidade oxidativa mitocondrial e reduzir a motilidade espermática. Embora não se tenha mensurado o Zn no fluído epididimal, as correlações entre o nível sérico e defeitos totais de peça intermediária e gota citoplasmática proximal foram significativas para ambos tratamentos (Tabela 2) demonstrando que é possível a presença destas alterações frente às variações na concentração de Zn.

Para os touros do T1, a média geral da concentração sérica de Zn foi superior em relação ao T2 ($0,72 \pm 0,01$ x $0,66 \pm 0,01$, Tabela 1), evidenciando uma condição já reportada em homens subférteis (Wong et al., 2001). No entanto, a elevação dos níveis séricos em indivíduos deficientes é desconhecida, podendo estar ligada a alterações nas concentrações de outros minerais e na sua capacidade de transporte, demanda e metabolismo em diferentes órgãos (Salgueiro et al., 2000; Wong et al., 2001). Para os touros do T2, a média dos percentuais de cabeça isolada normal ($6,9 \pm 0,57$, Tabela 1) estavam dentro de valores considerados normais para a espécie bovina. Entretanto, sua correlação ($r = -0,30$, Tabela 2) com a concentração de Zn sanguíneo sugere o envolvimento da função exocítica e endocítica do ductos extra gonadais. Portanto, o quadro seminal caracterizado pela elevação de defeitos de peça intermediária, cauda e cabeça isolada normal, além de refletir mudanças no transporte espermático, está associado a variações no nível circulante de Zn.

Em relação a morfometria da cabeça espermática (especialmente para estimativa da área Tabela 3), em ambos tratamentos, os resultados estão de acordo com as observações de Foote et al. (2003), que comparou a área da cabeça espermática em diferentes métodos de coloração. Por submeter os espermatozóides a um tratamento ácido (HCl 5N/30 minutos) o método de Fuelgen reduz o tamanho da célula e não representa a medida exata esperada para a morfometria. Porém, a vantagem deste método reside na identificação de defeitos no núcleo espermático, nem sempre evidentes em outros métodos (Sprenger & Coe 1995).

As diferenças encontradas na morfometria da cabeça espermática foram expressas nas distintas medidas aplicadas. É possível que os mecanismos envolvidos na organização e formação do núcleo espermático estejam envolvidos nas alterações observadas. Segundo Dadoune (2003), durante a segunda metade da espermiogênese, o núcleo das espermátides sofre duas profundas transformações reconfigurando a matriz nuclear decorrente da mudança do formato esférico

para o alongado, único e característico para cada espécie. Ainda, a compactação da cromatina espermática está diretamente associada à completa estabilização da protamina do tipo 1, cuja ligação covalente com o DNA envolve a participação do Zn (Denny & Ashworth, 1991).

Da mesma forma, o efeito das características morfológicas também revelou a importância do defeito espermático dentro de cada tratamento (efeito da interação). Neste caso, os defeitos de cabeça foram diferentes significativamente para a área e largura inferior (Tabelas 3). Isto mostra que além das análises objetivas, estabelecidas pelas medidas morfométricas, os defeitos de cabeça podem ser quantificados, incluindo diferentes variações de formato.

Ao considerar apenas os espermatozóides com fragmentação nuclear em comparação aos morfológicamente normais, novamente identificou-se células maiores, com exceção da largura superior, para os espermatozóides com defeito (Tabela 7). Com base na classificação da amplitude harmônica das medidas do núcleo espermático estabelecida pela citometria de fluxo, Ostermeier et al. (2001) verificaram maior integridade da cromatina em espermatozóides com maior largura superior e menor largura inferior, formato encontrado para aquele encontrado nos touros do T1. Em outro estudo, correlações entre morfometria e espermatozóides com núcleo fragmentado, mostraram que a presença de células mais largas na região superior ($r = 0,48$), de maior comprimento ($r = 0,42$) e largura inferior mais estreita ($r = -0,48$) são as mais suscetíveis à fragmentação nuclear (Fernandes et al., 2004). Portanto, a deficiência de Zn na alimentação dos touros desde o nascimento caracteriza-se por um perfil morfológico diferenciado com base na morfometria e formato da cabeça espermática possivelmente pela permanência de um processo degenerativo durante a espermiogênese.

Conclusões

Touros com concentrações deficientes de zinco (média anual de 15,45 mg/kg na matéria seca da dieta basal) apresentaram qualidade espermática inferior e maior nível sérico de zinco em relação a touros suplementados com 60 mg/kg de zinco/dia pelo suplemento mineral.

A deficiência de zinco pode induzir alterações na morfometria da cabeça espermática, associada à presença de fragmentação nuclear.

Referências Bibliográficas

ALLEN, J.G.; MASTERS, H.G.; PEET, R.L.; MULLINS, K.R.; LEWIS, R.D.; SKIRROW, S.Z.; FRY, J. Zinc Toxicity in Ruminants. **Journal Comparative Pathology**, London, v.93, p.363-377, 1983.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, H.R. *In Vitro* evaluation of sperm quality: a opinion. **Journal of Adrology**, v.4, n.6, p.397-406, 1993.

AMANN, R.P.; HAMMERSTEDT, R.H.; VEERAMACHANENI, D.N.R. The epididymis and sperm maturation: a Perspective. **Animal Reproductive Dev.** v.5, n.4, p.361-381, 1993.

AMELAR, R.D.; DUBIN, L; SCHOENFELD, C. Sperm motility. **Fertilization Sterilization**, v.34, n.3, p.197-215, 1980.

AUGER, J.; DADOUNE, J. P. The nuclear status of human sperm cells by TEM image cytometry: changes in nuclear shape and chromatin texture during spermiogenesis and epididymal transit. **Biological Reproduction**, v.49, p.166-175, 1993.

BALHORN, R A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. **Journal Cellular Biology.**, v.93, n.2, p.298-305, 1982.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press; 8-17, 1989.

BEDWAL, R.S.; BAHUGUNA, A. Zinc, copper and selenium in reproduction. **Experientia**, Basel, Birkhäuser Verlag, v.50, p.626-640, 1994.

BOERSMA, A.; RABHOFER, R.; STOLLA, R. Influence of sample preparation, stining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyser integrated visual optical system. **Reproduction Domestic Animal**, v.36, p.222-29, 2001.

CALVIN, H.I.; YU, C.C.; BEDFORD, J.M. Effects of epididymal maturation, zinc (II) and copper (II) on the reative sufhydryl content of structural elements in rat spermatozoa. **Exp. Cell. Res.**, v.81, p.333-341, 1973.

DADOUNE, J.P. Morphogenesis, organization and anomalies of the nucleus in human spermatozoa. **Pathology Biological**, v.41, n.3, p.220-21, 1993.

DENNY, P.; ASHWORTH, A. A zinc finger protein-encoding gene expressed in the post-meiotic phase of spermatogenesis. **Gene**, v.106, p.221-227, 1991.

FERNANDES, C. E.; MARTINS, C. F. Componentes principais da análise regressão para variáveis do espermograma em touros Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 17, 2003, Porto Alegre. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, Porto Alegre: UFRGS, p. 344. 2003.

FERNANDES, C. E. SILVA, A. E. F. D., AZEVEDO, H. C., BICUDO, S. D., OLIVEIRA, A. R., LOPES, S. C. P.; MORAES, S. S. Morfometria da cabeça espermática e correlação com demais variáveis seminais em touros Nelore com alterações na espermiogênese. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, 2004, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, SBZ. CD-ROM, 2004.

FERNANDES, C. E., MORAES, S.S., OLIVEIRA, A. R., LOPES, S.C.P., AMARAL, T.B., SOARES, C. O. Efeito de diferentes níveis de Zinco na alimentação sobre as características seminais de touros jovens criados a campo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BUIATRIA, 5, 2003, Salvador. *Anais...* Salvador, 2003, p. 81. 2003.

FOOTE, R. Effect of processing and measuring procedures on estimated sizes of bull sperm heads. **Theriogenology**, v.59, p.1765-1773, 2003.

FUENTES-MASCORRO, G.; VERGARA-ONOFRE, M.; MERCADO, E.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, O.; ROSADO, A. Participation of DNA structure on sperm chromatin organization. **Archives of Andrology**, v.45, p.61-71, 2000.

GRAHAM, T. W. Trace element deficiencies in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 7, p. 153-215, 1991.

HENKEL, R.; BITTNER, J.; WEBER, R.; HUTHER, F.; MISKA, W. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. **Fertility Sterility**, v.71, n.6. p.1138-1143, 1999.

HIDIROGLOU, M. & KNIPFEL, J.E. Zinc in Mammalian Sperm: A Review. **Journal Dairy Science.**, v.67, p.1147-56, 1984.

KENDALL, N.R.; McMULLEN, S.; GREEN, A.; RODWAY, R.G. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. **Animal Reproduction Science**, United Kingdom, v.62, p.277-28, 2000.

KVIST, U. Spermatozoal thiol disulphite interaction: a possible event underlying physiological sperm nuclear chromatin descondensation. **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v. 115, p. 503-505, 1982.

KVIST, U.; BJORNDHAL, L. Zinc preserves an inherent capacity for human sperm chromatin descondensation. **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v. 124, p. 195-200, 1985a.

KVIST, U.; BJORNDHAL, L.; ROOMANS, M.; LIDHOMER, C. Nuclear zinc in human epididymal and ejaculated spermatozoa. **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v. 125, p. 1-13, 1985b.

KVIST, U.; BJORNDHAL, L.; KJELLBERG, L. Sperm nuclear zinc, chromatin stability and male fertility. **Scanning Microscopy**, Chicago, v. I, p. 1241-1247, 1987.

MAZRIMAS, J.A.; CORZETT, M.; CAMPOS, C.; BALHORN, R. A corrected primary sequence for bull protamine. **Biochemistry Biophysics. Acta**, v.872, n.1-2, p.11-5, 1986.

MORAES, S. S. **Avaliação da deficiência sub-clínica de zinco em vacas de cria e relação com a higidez de seus bezerros.** Comunicado Técnico, COT Nº 65 agosto de 2001, Disponível em <http://www.cnpqc.embrapa.br>. Capturado em 20/10/04.

OLIVEIRA, A. R., MORAES, S. S., FERNANDES, C. E., LOPES, S. C. P., SOARES, C. O., AMARAL, T.B.; MIRANDA, P. A. B. Efeito de diferentes níveis de zinco na dieta sobre a qualidade seminal e correlação com a concentração do zinco circulante no plasma seminal de touros. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41, Campo Grande. *Anais...* Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. CD-ROM, 2004.

OSTERMEIER, G.C.; SARTOR-BERGFELT, R.; SUSKO-PARRISH, J.L. & PARRISH, J.J. Bull fertility and sperm nuclear shape. **Ag. Biotech. Net**, v.2, 2000.

OSTERMEIER, G.C.; SARGEANT, G.A.; YANDELL, B.S.; PARRISH, J.J. Measurement of bovine sperm nuclear shape using fourier harmonic amplitudes. **Journal Andrology**, v.22, n.4, p. 84-594, 2001.

SAILER B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P. Bull sperm head morphometry related to abnormal chromatin structure and fertility. **Cytometry**, v.24, n.2, p.167-173, 1996.

SALGUEIRO, M.J.; ZUBILLAGA, M.; LYSIONEK, A.; CREMASCHI, G.; GOLDMAN, C.G.; CARO, R.; DE PAOLI, T.; HAGER, A.; WEILL, R.; BOCCIO, J. Zinc status and immune system relationship: a review. **Biological Trace Elements. Research.**, v.7, n.3, p.193-205, 2000.

SALISBURY, G.W.; Van DONGEN, C.G. The validity of van Duijin's formula for head area of bovine spermatozoa. **Microscopie**, v.18, p.144-14, 1963.

SPRECHER, D.J.; COE, P.H. Differences in bull spermiograms using eosin-nigrosin stain, fuelgen stain, and phase contrast microscopy methods. **Theriogenology**, v.45, p.757-764, 1995.

UNDERWOOD, E.J.; SOMERS, M. Studies of zinc nutrition in sheep. 1. The relation of zinc to growth, testicular development and spermatogenesis in young rams. **Australien. Journal Agriculture Research**, v.20, p.889-897, 1969.

Van DUIJIN, Jr.C. Mensuration of the heads of bull spermatozoa. **Microscopie**, v.14, p.265-276, 1960.

WONG, W.Y.W.; FLIK, G.; GROENEN, P.M.W.; SWINKELS, D.W.; THOMAS, C.M.G.; COPIUS-PEEREBOOM, J.H.J.; MERKUS, H.M.W.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. **Reproductive Toxicology**, v.15, p.131-136, 2001.