

# ALTERAÇÕES NA MORFOLOGIA ESPERMÁTICA EM TOUROS DE CORTE COM E SEM SUPLEMENTAÇÃO DE ZINCO NA MISTURA MINERAL

CARLOS EURICO FERNANDES,<sup>1</sup> ALEXANDRA ROCHA OLIVEIRA<sup>2</sup>, PAULA DE ALMEIDA BARBOSA MIRANDA,<sup>3</sup> SIMONE DA CUNHA PEREIRA LOPES,<sup>3</sup> SHEILA DA SILVA MORAES,<sup>3</sup> MARIA DA GRAÇA MORAIS,<sup>4</sup> URBANO GOMES PINTO DE ABREU<sup>5</sup> E FERNANDA DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA<sup>6</sup>

- 
1. Professor adjunto do Departamento de Patologia, CCBS, UFMS
  2. Doutoranda da UNESP, campus de Jaboticabal. E-mail: alexandra\_oliveira@yahoo.com.br
  3. Pesquisadoras da Embrapa Gado de Corte
  4. Departamento de Produção Animal, FAMEZ
  5. Pesquisador da Embrapa Pantanal
  6. Departamento de Radiologia e Reprodução Animal, FMVZ, UNESP.

---

## RESUMO

Características seminais de touros provenientes de um rebanho sem Zn na suplementação mineral (ZN-0, n=4, 0mg/Zn/kg/dia) foram comparadas com as de touros contemporâneos criados com suplementação adequada (ZN-60FI, n=4, 60mg/Zn/kg/dia). O sêmen foi colhido quinzenalmente, entre 17 e 29 meses de idade. Incluíram-se no exame a análise da cromatina espermática e o perfil morfométrico da cabeça espermática, com base no comprimento, largura superior e inferior ( $\mu\text{m}$ ) e área ( $\mu\text{m}^2$ ). Os touros do ZN-0 apresentaram redução de espermatozoides normais em relação ao ZN-60FI ( $62,4 \pm 2,88\%$  x  $74,5 \pm 2,83\%$ ), sendo que a prevalência de anormalidades de cromatina ( $16,7 \pm 2,05\%$ ) e de defeitos de peça intermediária ( $9,3$

$\pm 0,81\%$ ) foi superior aos do ZN-60FI ( $9,5 \pm 2,03$  e  $3,2 \pm 0,80$ , respectivamente). A microscopia eletrônica de transmissão mostrou irregularidades mitocondriais e ruptura dos feixes de fibras densas externas. Nos touros do ZN-60FI, a área da cabeça espermática foi proporcionalmente inferior a do ZN-0. Conclui-se que touros criados e mantidos a campo, provenientes de rebanhos com deficiência na suplementação de Zn, estão sujeitos à redução da qualidade seminal, por apresentarem maior frequência de anormalidades morfológicas, na cromatina, e nos padrões morfométricos da cabeça espermática com predomínio de lesões na estrutura mitocondrial e nos feixes de fibras densas na peça intermediária.

**PALAVRAS-CHAVES:** Bovino, cromatina, morfometria espermática, nutrição, qualidade seminal, zinco.

---

## ABSTRACT

### SPERMATIC MORPHOLOGY ALTERATIONS IN BEEF BULLS SUPPLEMENTED OR NOT WITH ZINC IN MINERAL SALT

Seminal characteristics of bulls without Zn in the mineral supplementation (ZN-0, n=4, 0mg/Zn/kg/dia) were compared with bulls contemporary with appropriate mineral supplementation (ZN-60FI, n=4, 60mg/Zn/kg/dia). The semen was evaluated biweekly, between 17 and 29 months of age. The prevalence of abnormal chromatin and morphometric profile (length, superior and inferior width ( $\mu\text{m}$ ) and area ( $\mu\text{m}^2$ ) of the sperm head were included in the

analysis. ZN-0 bulls presented reduction of normal sperms in relation to ZN-60FI ( $63.3 \pm 2.88$  x  $74.5 \pm 2.83\%$ ), higher abnormal chromatin ( $16.7 \pm 2.05$  x  $9.3 \pm 0.81\%$ ) and abnormal intermediate piece ( $9.3 \pm 0.81$  x  $3.2 \pm 0.80\%$ ), respectively. Abnormalities of intermediate piece were characterized by irregularities in the mitochondrial organization and rupture of the external dense fibers in electronic microscopy. The area of head sperm of ZN-60 bulls was lower ( $25.0 \pm 3.8$  x

27.9 ±4.6,  $p < 0.01$ ) in relationship to ZN-0, respectively. We concluded that bulls born and maintained in the field conditions coming of herds with subclinic deficiency of Zn in the basal diet, are subject the reduction of the seminal

quality and present larger frequency of intermediary piece abnormalities, sperm chromatin and variations on morphometrics measurements of head sperms.

KEY WORDS: Bovine, chromatin, nutrition, semen quality, sperm morphometry, 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 é um desafio constante no sentido de estabelecer metodologias direcionadas ao aumento da produtividade. Nas regiões de clima tropical onde há predomínio de vegetação do tipo cerrado e solos de baixa fertilidade, o Zn tem recebido atenção especial, devido ao seu baixo nível encontrado no perfil mineral de diferentes forrageiras utilizadas na produção bovina (MORAES, 2001; MANDAL et al., 2007).

Recentemente, OLIVEIRA et al. (2007) encontraram evidências de que a concentração de Zn na dieta afeta a qualidade seminal em touros no período puberal. Especialmente na morfologia espermática, os autores encontraram elevação de defeitos na peça intermediária e cauda, com subsequente baixa motilidade e maior prevalência de defeitos de cabeça nos animais sem suplementação de Zn no sal mineral. No macho, a deficiência de Zn tem sido reportada à atrofia do epitélio tubular, redução na produção dos hormônios luteinizante, foliculo estimulante e testosterona com inibição da espermatogênese (UNDERWOODS & SOMERS, 1969; FAVIER, 1992). Segundo ALLEN et al. (1983), o conteúdo de Zn é alto nos testículos de animais adultos, sendo que a maior concentração desse mineral encontra-se na próstata. Porém, deficiências marginais de Zn nem sempre acarretam distúrbios metabólicos clinicamente diagnosticáveis, embora possam ocasionar alterações na qualidade do sêmen (SALGUEIRO et al., 2000).

A participação efetiva do Zn na estrutura espermática nos bovinos ainda não está totalmente compreendida. Nos mamíferos, de modo geral, o conteúdo de Zn nas espermatogônias e espermató-

citós primários é similar ao observado em células somáticas, porém, a partir das espermatídes, há mudanças na incorporação desse elemento na matriz nuclear. Durante a espermiogênese e, portanto, durante a remodelação das espermatídes, o Zn liga-se aos grupamentos sulfídricos das cisteínas e auxilia a compactação das protaminas, protegendo-as dos processos oxidativos (MARZRIMAS et al., 1986; DADOUNE, 1993). A expressão de genes da família *Zfp-29* possibilita este mecanismo, determinando a transcrição de uma proteína de 68,7 kDa associada à regulação da capacidade de compactação e condensação da cromatina espermática (DENNY & ASHWORTH, 1991). Assim, pressupõe-se que níveis insuficientes de Zn na dieta, por longos períodos, resulte em falhas da função nuclear, especialmente em tecidos em proliferação e diferenciação. No caso das espermatídes, leva à desestabilização da cromatina, à maior fragilidade do DNA e, conseqüentemente, a variações no perfil morfométrico da cabeça espermática (KVIST et al., 1987; OSTEMEIER et al., 2000).

Além de compor a estrutura nuclear, o Zn está associado à função energética espermática. Embora a formação da peça intermediária e da cauda espermática ocorra nos túbulos seminíferos, é na cabeça, corpo e cauda do epidídimo que essas estruturas atingem plena função bioquímica (AMANN 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 sobre dois pares de túbulos centrais (AMELAR et al., 1980). Íons Zn predominam nas fibras densas externas e contribuem na prevenção da oxidação dos grupamentos dissulfídricos (CALVIN et al., 1973). À medida que os espermatozoides avançam no epidídimo, especialmente na cauda e após ejaculação, o conteúdo de Zn reduz-se em mais de

60%, aumentando progressivamente a 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. Nos bovinos, porém, poucos estudos têm investigado a associação do Zn com variações na motilidade espermática.

Em touros de corte, alterações no formato e no contorno da cabeça espermática estão presentes em níveis variáveis e associam-se a alterações na espermogênese, possivelmente com substancial redução na fertilidade (SAILER et al., 1996; FERNANDES et al., 2004). Os métodos convencionais para o estudo da morfologia incluem a avaliação visual microscópica de alterações em regiões específicas do espermatozoide e, desse modo, a avaliação do formato da cabeça do espermatozoide é realizada de forma subjetiva. No sentido de diminuir a possibilidade de avaliação subjetiva, análises morfométricas, com auxílio da computação, vêm sendo amplamente utilizadas. Medidas morfométricas em planimetria permitem a estimativa da área, perímetro, comprimento e largura, determinando perfis e suas variantes frente a alterações no espermograma (BOERSMA et al., 2001; FOOTE, 2003). Uma vez que a morfologia da cabeça espermática tem grande importância na fertilização e liberação do genoma masculino no ovócito, tais medidas têm sido usadas na avaliação da fertilidade e na integridade da cromatina nuclear.

Os objetivos deste estudo foram de avaliar o espermograma, assim como variações na integridade da cromatina espermática e o perfil morfométrico da cabeça espermática em touros Nelore com e sem deficiência de Zn na dieta.

## MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia deste estudo, no que tange à formação e preparação dos piquetes experimentais, composição dos grupos experimentais, análises de solo, forragem e perfil plasmático do Zn, foram previamente detalhados por OLIVEIRA et al. (2007). Para fins deste experimento, foram

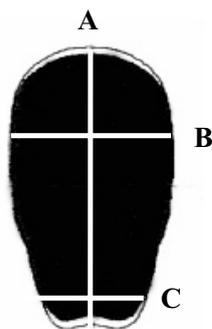
avaliados oito touros pertencentes aos tratamentos Zn-0 (n=4), sem fonte de Zn no sal mineral e Zn-60FI (n=4), com 60 mg de Zn fonte inorgânica. Resumidamente, formulou-se a mistura mineral para cada tratamento para pasto de médio nível nutricional, com os seguintes níveis de suplementação/dia: cálcio=1.040 g; fósforo=800 g; sódio=1.000 g; cobre=10 mg; cobalto=0,2 mg; iodo=0,5 mg; selênio=0,2 mg. As fontes dos minerais foram fosfato bicálcico, cloreto de sódio, sulfato de cobre, sulfato de cobalto, iodato de potássio e selenito de sódio. Assim, a variação dos níveis de suplementação de zinco foi o que diferiu os tratamentos. Para fins de acompanhamento das características nutricionais dos animais, consideraram-se as médias entre estação seca (abril a setembro) e chuvosa (outubro a março) para o consumo de sal mineral (g/unidade animal), concentração média de Zn na forragem (mg/kg) e média de Zn na matéria seca (g/dia).

A partir dos dezessete meses de idade, os animais passaram a ser submetidos a exame andrológico a cada quinze dias, para acompanhamento da qualidade seminal. O período experimental compreendeu de fevereiro de 2003 a janeiro de 2004. O sêmen foi colhido por eletroejaculação, sendo que, imediatamente após, estimaram-se a motilidade (%) e o vigor (1-5), em lâmina e lamínula sob microscopia de campo claro. Amostras foram diluídas em formol-salino tamponado 1% e avaliadas posteriormente para morfologia espermática em microscopia de contraste de fase (preparações úmidas, 1000x). Contaram-se 200 células/lâmina, para determinação do percentual de espermatozoides 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 retroaxial), cabeça destacada (contorno e forma normais), segundo PIMENTEL (2001). Para fins de análise, consideraram-se as médias mensais obtidas de cada touro, no período de fevereiro de 2003 a janeiro 2004.

Defeitos no núcleo espermático e condensação anormal da cromatina foram estimados

pela reação de Feulgen (BARTH & OKO, 1989). Após a realização do esfregaço, as lâminas foram embebidas em solução de ácido clorídrico 5N por trinta minutos e, em seguida, lavadas com água destilada e mergulhadas em reativo de Schiff por trinta minutos. Posteriormente, foram lavadas em água corrente por cinco minutos e, após secagem, mergulhadas em solução de ácido periódico a 2%, por trinta minutos, novamente lavadas e secas em ambiente laboratorial. Procedeu-se à leitura em microscopia de contraste de fase em imersão (1000x), estimando-se, em duzentos espermatozoides, o percentual de formas com condensação anormal na cromatina, ou seja, núcelos que apresentavam fragmentação, estavam descorados (tipo “fantasma”) ou com halos claros na região central, segundo SPRENCHER & COE (1995).

Os mesmos esfregaços foram usados para análise morfométrica da cabeça espermática. Nesta análise, selecionaram-se, ao acaso, dois touros pertencentes ao Zn-60FI (coeficiente de variação abaixo de 5% entre medidas da cabeça espermática) considerados animais-controle e comparados com os do Zn-0 (n=4). Mensuraram-se trinta espermatozoides em, no mínimo, cinco campos/lâmina, sendo dez com morfologia normal, dez com anormalidades de cabeça e dez com anormalidades de peça intermediária. As imagens foram captadas digitalmente, armazenadas e processadas em aumento de 1000x em microscopia de campo claro (Kontron Elektronik Imaging System, KS400-2.0). Determinaram-se o comprimento, a largura superior (na região da maior medida) e a largura inferior (na região da base espermática) em  $\mu\text{m}$  e área total em  $\mu\text{m}^2$  pela equação:  $\text{área} = [(\text{largura superior (B)} + \text{largura inferior (C)})/2 \times \text{comprimento (A)}]$ , conforme a Figura 1.



**FIGURA 1.** Representação das medidas obtidas da cabeça espermática: A, comprimento ( $\mu\text{m}$ ), B, largura superior ( $\mu\text{m}$ ) e C, largura inferior ( $\mu\text{m}$ ).

Posteriormente ao término do período experimental, encaminharam-se amostras de um dos touros do Zn-0 (C), que apresentava alto percentual de defeitos de peça intermediária e cauda, para análise ultraestrutural. Para isso, fixou-se 1 mL de sêmen em 5 mL de 2,5% de glutaraldeído em tampão fosfato a 0,1M (pH 7,4) e, posteriormente, em 1% de tetróxido de ósmio utilizando o mesmo tampão. Após a desidratação, em séries crescentes de acetona, o material foi embebido em Epon 812. Obtiveram-se os cortes ultrafinos com navalha de diamante, montados em grade de cobre e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes foram, então, examinados em um microscópio eletrônico de transmissão Philips EM 301, no Centro de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu-SP. Devido à importância da orientação da célula para avaliação uniforme, os espermatozoides, especialmente a região da peça intermediária, foram estudados utilizando-se secções longitudinais e transversais.

A análise estatística foi dividida em duas etapas. Na primeira, verificou-se o efeito da suplementação mineral com ou sem zinco (efeito de tratamento) e de touro sobre o espermiograma, estimado pela microscopia de contraste de fase, com base em modelo linear completamente casualizado (teste F), ajustando-se as médias para data da colheita e peso corporal (covariância). Na segunda etapa, verificou-se o efeito de tratamento sobre o comprimento ( $\mu\text{m}$ ), a largura superior ( $\mu\text{m}$ ), a largura inferior ( $\mu\text{m}$ ) e a área ( $\mu\text{m}^2$ ) da cabeça espermática, ajustando-se o modelo para o efeito de touro. Incluiu-se, ainda, como fator fixo, a característica primária da célula (normal, com anormalidade de cabeça ou com anormalidade de peça intermediária). As médias foram comparadas pelo teste F em um modelo inteiramente casualizado, para  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos aspectos observados neste estudo, destaca-se o fato de que os touros do Zn-0 eram provenientes de vacas cuja gestação foi conduzida com baixos níveis de Zn na dieta. Essa condição,

embora não seja adequada, pode ser comum em regiões onde sabidamente os níveis de Zn na forragem são inferiores para os requerimentos diários, sem que haja reposição suplementar adequada (MORAES, 2001). Assim, as alterações encontradas sugerem que a deficiência ou falha prolongada na suplementação mineral de Zn, em touros mantidos a campo, pode afetar a espermiogênese e, assim, contribuir para redução da qualidade seminal.

O consumo médio do sal mineral foi de 57,4 g/UA para o Zn-0 e de 39,3g/UA para o Zn-60FI, no período seco, e de 95,1 g/UA para o Zn-0 e 52,2 g/UA para o Zn-60FI no período chuvoso. A concentração média de zinco no pasto do Zn-0 variou de 13,1 (seca) a 17,8 mg/kg (chuva) e no pasto do Zn-60FI variou de 12,8 (seca) a 16,7 mg/kg (chuva) na matéria seca, respectivamente. As médias anuais estimadas de zinco na matéria seca da dieta total consumida pelos touros (zinco do sal mineral mais a da forrageira) foram de 0,17 g/dia (chuva) e 0,12 g/dia (seca) para os do Zn-0, 0,97 g/dia (chuva) e 0,53 g/dia (seca) para os do Zn-60FI. Esses dados demonstram que ao longo do período experimental a concentração de Zn fornecida pela forrageira estava abaixo do recomendado para bovinos segundo o NRC (1996). Assim, os touros do Zn-0 permaneceram com deficiência na suplementação, sugestivo de uma condição subclínica prolongada.

Os efeitos da deficiência ou da suplementação de Zn após períodos de seca e, portanto, com restrições na qualidade das forrageiras sobre a qualidade seminal, têm sido discutidos na literatura; no entanto, no Brasil, há poucos estudos verificando esses aspectos (MORAES et al., 2001; NOGUEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007).

O quadro espermático dos touros sem suplementação (Tabela 1) apresentou redução de espermatozoides normais ( $63,3 \pm 2,88\%$ ), sendo que a prevalência de anormalidades de cromatina ( $16,7 \pm 2,05\%$ ) e de defeitos de peça intermediária ( $9,3 \pm 0,81\%$ , caracterizados pelo tipo *dag defect* e *bent tail*, Figura 3), foram maiores do que as verificadas nos touros com suplementação de Zn, com destaque para os touros A, B e C, que

apresentaram percentuais elevados destes defeitos. Em touros de corte criados em campo, essas anormalidades ocorrem geralmente em baixos percentuais no exame de sêmen e em animais com processos patológicos testiculares (PIMENTEL, 2001). Porém, já foram identificadas em touros inférteis com suposta deficiência de Zn na alimentação (BLOM & WOLSTRUP, 1976). Na peça intermediária, as alterações observadas reduzem a motilidade e vigor espermático, em razão das modificações no alinhamento, condensação e organização dos feixes mitocondriais (Figura 3). Essas alterações indicam a presença de alterações como a astenospermia e oligospermia semelhantes ao encontrado em humanos com deficiência de Zn na dieta (CHEMES et al., 1998; WONGRAM et al., 2000; BACCETTI et al., 2004), intimamente associadas a transtornos na espermiogênese. Outros estudos, no entanto, evidenciaram que a deficiência de Zn causa alterações mais proeminentes na condensação da cromatina nuclear nas espermátides, decorrente da supressão de genes reguladores do Zn (KVIST et al., 1987; DENNY & ASHWORTH, 1991), possivelmente, relacionado aos altos percentuais de defeitos de núcleo e cromatina.

Pela coloração de Feulgen foi possível a identificação de níveis variados de fragmentação nuclear. Neste método, os espermatozoides são submetidos à hidrólise ácida, que destaca as bases purinas das riboses, expondo os grupos aldeídos presentes no DNA. Nos locais onde há ruptura dessas bases e descondensação da cromatina, os agrupamentos aldeídos ficam livres e não reagem com a fucsina básica (pararosanilina), formando quebras ou rachaduras nucleares (KASTEN, 1960; CHIECO & DERENZINI, 1999).

Anormalidades desse tipo também podem ser encontradas em processos degenerativos, inflamatórios e em certos tumores testiculares caracterizando quadros específicos (BARTH & OKO, 1989), porém, neste estudo, a média ajustada para a data da colheita indica que ao longo do período experimental houve, de forma contínua, médias superiores para os defeitos observados, sugerindo envolvimento da espermiogênese, sem indícios clínicos e com caráter irreversível.

**TABELA 1.** Médias ajustadas para comparação das características seminais entre touros Nelore com e sem suplementação de Zinco no sal mineral da dieta entre 17 e 29 meses de idade

Características seminais	0 mg/kg/dia de Zn (ZN-0)				60 mg/kg/dia de Zn inorgânico (ZN-60FI)					
	Touros				Touros					
	A	B	C	D	Média	E	F	G	H	Média
Motilidade (%)	55,0 ±4,81 <sup>a</sup>	56,6 ±4,81 <sup>a</sup>	32,0 ±5,00 <sup>b</sup>	65,8 ±4,80 <sup>c</sup>	52,3 ±2,42 <sup>*</sup>	70,8 ±4,81 <sup>a</sup>	74,1 ±4,81 <sup>a</sup>	60,0 ±4,81 <sup>b</sup>	75,0 ±4,82 <sup>a</sup>	70,0 ±2,75
Vigor (1 a 5)	3,0 ±0,21 <sup>a</sup>	2,6 ±0,21 <sup>a</sup>	1,3 ±0,21 <sup>b</sup>	3,5 ±0,21 <sup>a</sup>	2,6 ±0,11 <sup>*</sup>	3,6 ±0,21 <sup>a</sup>	3,8 ±0,22 <sup>a</sup>	3,2 ±0,22 <sup>a</sup>	4,0 ±0,22 <sup>a</sup>	3,7 ±0,15
Morfologia (%)										
Normais	72,4 ±4,33 <sup>a</sup>	69,8 ±4,33 <sup>a</sup>	32,4 ±4,52 <sup>b</sup>	79,9 ±4,31 <sup>a</sup>	62,4 ±2,88 <sup>*</sup>	72,4 ±4,33 <sup>a</sup>	76,0 ±4,33 <sup>a</sup>	76,5 ±4,33 <sup>a</sup>	72,2 ±4,33 <sup>a</sup>	74,5 ±2,83
Defeitos de cabeça	6,6 ±0,92 <sup>a</sup>	4,7 ±0,92 <sup>a</sup>	5,2 ±0,92 <sup>a</sup>	5,2 ±0,92 <sup>a</sup>	5,5 ±0,55 <sup>*</sup>	3,6 ±0,92 <sup>a</sup>	3,5 ±0,92 <sup>a</sup>	3,2 ±0,92 <sup>a</sup>	1,6 ±0,81 <sup>a</sup>	3,0 ±0,40
Defeitos nucleares	12,0 ±3,15 <sup>a</sup>	8,2 ±3,15 <sup>a</sup>	39,5 ±3,32 <sup>b</sup>	9,2 ±3,62 <sup>a</sup>	16,7 ±2,05 <sup>d*</sup>	6,8 ±3,1 <sup>a</sup>	8,1 ±3,1 <sup>a</sup>	14,8 ±3,1 <sup>b</sup>	8,3 ±3,6 <sup>a</sup>	9,5 ±2,03
Defeitos de acrossomo	4,6 ±0,62 <sup>a</sup>	0,6 ±0,32 <sup>b</sup>	0,5 ±0,71 <sup>b</sup>	1,4 ±0,63 <sup>b</sup>	1,8 ±0,30	2,6 ±0,60 <sup>a</sup>	1,3 ±0,30 <sup>a</sup>	1,7 ±0,60 <sup>a</sup>	0,5 ±0,60 <sup>b</sup>	1,5 ±0,30
Defeitos de PI	8,6 ±1,71 <sup>a</sup>	8,8 ±1,71 <sup>a</sup>	16,9 ±1,82 <sup>b</sup>	2,71 ±1,7 <sup>c</sup>	9,3 ±0,81 <sup>*</sup>	3,2 ±1,7	2,0 ±1,7	2,6 ±1,7	4,8 ±1,7	3,2 ±0,80
GCP	1,4 ±0,32 <sup>a</sup>	0,4 ±0,32 <sup>b</sup>	2,7 ±0,32 <sup>c</sup>	0,3 ±0,32 <sup>b</sup>	1,2 ±0,20 <sup>a*</sup>	0,6 ±0,23 <sup>a</sup>	0,4 ±0,32 <sup>a</sup>	0,1 ±0,10 <sup>a</sup>	0,0 ±0,0 <sup>a</sup>	0,3 ±0,20
Defeitos de cauda	5,5 ±2,79 <sup>a</sup>	11,3 ±2,79 <sup>a</sup>	31,9 ±2,91 <sup>b</sup>	6,5 ±2,79 <sup>a</sup>	13,8 ±1,41 <sup>*</sup>	12,9 ±2,79 <sup>a</sup>	11,7 ±2,79 <sup>a</sup>	6,3 ±2,79 <sup>a</sup>	10,5 ±2,70 <sup>a</sup>	10,3 ±1,39
CIN	1,4 ±3,15 <sup>a</sup>	3,4 ±3,15 <sup>a</sup>	9,7 ±3,30 <sup>a</sup>	8,5 ±3,15 <sup>a</sup>	5,7 ±1,60 <sup>*</sup>	4,7 ±3,15 <sup>a</sup>	5,0 ±3,15 <sup>a</sup>	9,0 ±3,15 <sup>a</sup>	9,1 ±3,15 <sup>a</sup>	6,9 ±1,58
Peso (kg) <sup>*</sup>	469,0 ±3,9 <sup>a</sup>	400,0 ±3,9 <sup>a</sup>	430,0 ±3,9 <sup>a</sup>	378,0 ±0,4 <sup>a</sup>	419,0 ±1,9	420,0 ±4,0 <sup>a</sup>	396,7 ±3,9 <sup>b</sup>	438,0 ±3,9 <sup>c</sup>	417,5 ±3,9 <sup>a</sup>	418,0 ±1,93
Perímetro escrotal (cm) <sup>1</sup>	30,0 ±0,20 <sup>a</sup>	31,4 ±0,21 <sup>b</sup>	30,8 ±0,20 <sup>a</sup>	30,3 ±0,20 <sup>a</sup>	30,6 ±0,17 <sup>*</sup>	25,6 ±0,20 <sup>a</sup>	31,1 ±0,20 <sup>b</sup>	31,3 ±0,20 <sup>b</sup>	30,7 ±0,20 <sup>b</sup>	29,6 ±0,28

± erro-padrão da média; letras diferentes entre colunas indicam efeito significativo entre touros para o mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ); \* indica efeito significativo ( $p < 0,01$ ) entre tratamentos, ajustado para o peso (418,8,  $p < 0,001$ ); <sup>1</sup>ajustado para o peso ao nascimento (30,8,  $p < 0,001$ ); PI, peça intermediária; GCP, gota citoplasmática proximal, CIN, cabeça isolada normal.

Esse aspecto ficou bem exemplificado no touro C, em razão da drástica redução na qualidade seminal, especialmente pelos percentuais de defeitos nucleares (39,5 ±3,32%) e peça intermediária (16,9 ±1,82%), resultando no decréscimo da motilidade, do vigor e do percentual de espermatozoides normais (Figura 3). Portanto, embora esses achados no espermograma não sejam exclusivos da deficiência de Zn na dieta, estão implícitos a essa condição e podem auxiliar no diagnóstico da subfertilidade em bovinos.

No segundo experimento, verificou-se o efeito dos tratamentos e de diferentes características morfológicas sobre a morfometria da cabeça espermática, com base na análise planimétrica originalmente descrita por VAN DUIJIN (1960). Independente do sistema classificatório adotado para análise da morfologia (defeitos primários, secundários, maiores ou menores), as variações na cabeça espermática refletem diretamente alterações ocorridas na espermiogênese. No entanto, um padrão aceitável para a variabilidade da forma da cabeça espermática pela análise visual não está

estabelecido no touro, o que torna esse atributo, de certa forma, subjetivo. Variações acima de 10% (coeficiente de variação da média) em medidas lineares da cabeça espermática são representativas de processos degenerativos e estão associadas à descondensação da cromatina nuclear (AUGER & DADOUNE, 1993). Os resultados da morfometria, para espermatozoides sem alterações de cabeça, estão de acordo com as medidas reportadas por FOOTE (2003), quando estimadas pela reação de Feulgen.

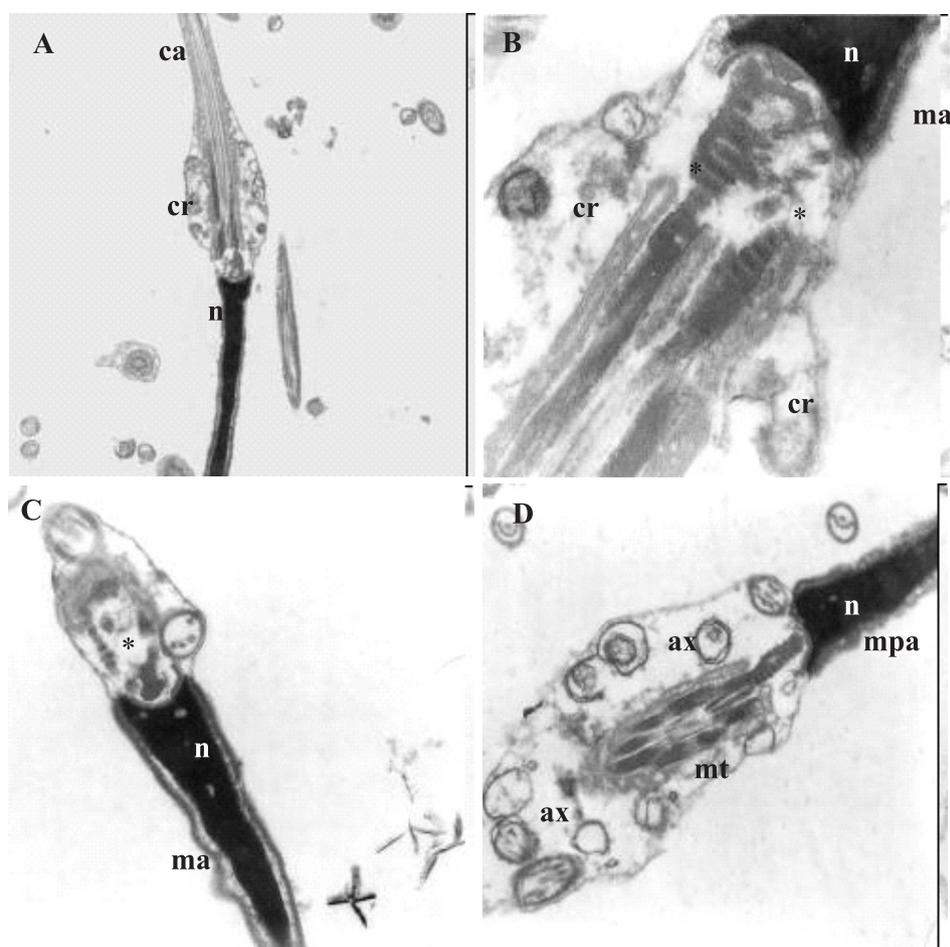
Houve diferença significativa para o comprimento, largura inferior e área, entre tratamentos e defeitos estudados (Figura 4). As diferenças encontradas demonstram substancial modificação na forma da cabeça espermática, com tendência a uma configuração mais alongada (formas delgadas) e mais retilínea, resultando em maior área por  $\mu\text{m}^2$ , nos touros com deficiência de Zn na dieta. Isso sugere que o padrão de remodelação da matriz nuclear, ao longo da espermiogênese, não foi mantido, expandindo o tamanho do núcleo, resultando no aumento da prevalência de

anormalidades na cromatina (DADOUNE, 1993; BOISSONNEAULT, 2002). Ao contrário, nos touros-controle, a área da cabeça espermática foi inferior ( $p < 0,01$ ), especialmente nos espermatozoides que apresentavam defeitos de cabeça, sugerindo um padrão de irregularidade diferente ao encontrado nos touros sem suplementação de

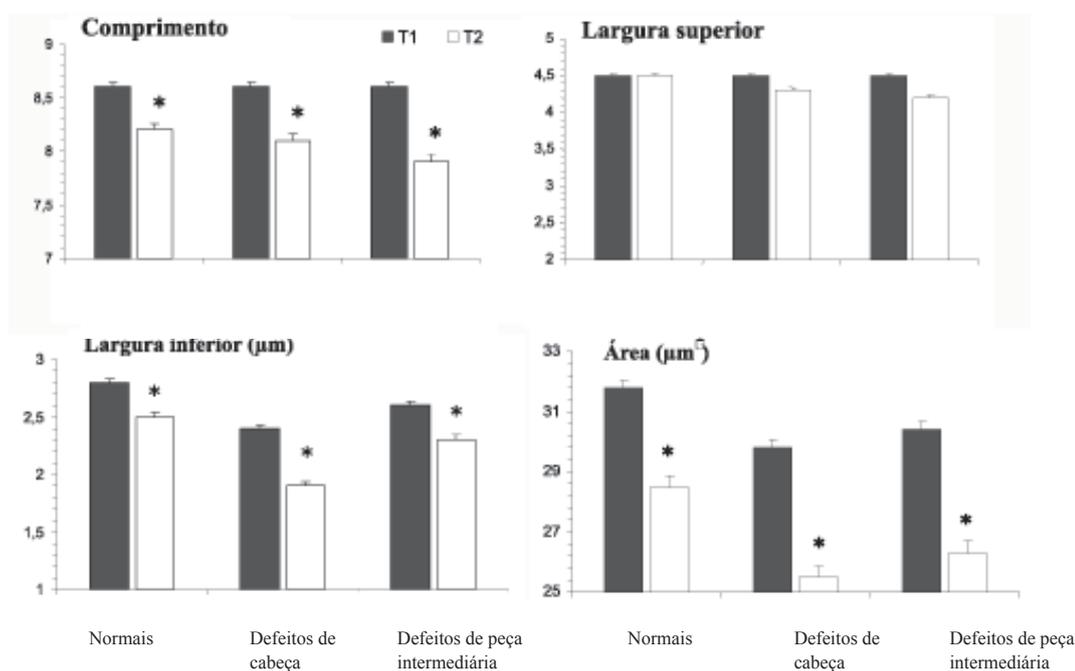
Zn na dieta. Esses resultados corroboram com medidas do núcleo espermático, estabelecidas por citometria de fluxo, proposta por OSTERMEIER et al. (2001), que observaram maior integridade da cromatina em espermatozoides com menor largura inferior e menor área total, formato encontrado nos touros-controle.



**FIGURA 2.** Características morfológicas dos defeitos de peça intermediária do tipo *dag defect* (A e B\*) e de cauda fortemente dobrada do tipo *bent tail* (B\*\*). Setas indicam a presença de vacúolos nucleares na cabeça espermática (C); setas indicam fragmentação total do núcleo espermático (D). N, núcleo normal. A, 1200x; B, 1000x; C, 1100x; D, 1000x em microscopia de contraste de fase. C,D, coloração pela reação de Feulgen.



**FIGURA 3.** Microscopia eletrônica de transmissão de espermatozoides com alterações de peça intermediária observadas no touro C do grupo ZN-0. A - espermatozoide com excesso de corpos residuais na região da peça intermediária ou alteração do tipo gota citoplasmática proximal (1950x)); (ca) cauda; (cr) corpos residuais; (n) núcleo. B - desorganização e irregularidade mitocondrial (\*) e ruptura dos feixes de fibras densas externas com presença de corpos residuais (cr), 15500x; mpa, membrana pós-acrossomal. C - alteração do tipo *tail stump* com alterações na composição e organização mitocondrial (\*) e nos feixes de fibras densas externas, 8400 x. D, alteração do tipo *dag defect* com deficiência no número de microtúbulos (mt) e ruptura das fibras axiais (ax), 6300x.



**FIGURA 4.** Médias e erro-padrão obtidos de espermatozoides normais, com defeitos de cabeça e peça intermediária para diferentes variáveis morfométricas da cabeça espermática em touros Nelore com 0 mg/Kg/dia//Zn (ZN-0, ■) e 60mg/Kg/dia/Zn (ZN-60FI, □) na dieta. \* p<0,01 entre tratamentos.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que touros criados e mantidos a campo, provenientes de rebanhos com deficiência subclínica de Zn na matéria seca da dieta basal, estão sujeitos à redução da qualidade seminal, por apresentarem maior frequência de anormalidades morfológicas resultantes de falhas na compactação da cromatina espermática, modificações nos padrões morfométricos da cabeça espermática e com predomínio de lesões na estrutura mitocondrial e nos feixes de fibras densas na peça intermediária. Além disso, os resultados encontrados indicam a necessidade de pesquisas sobre o nível de zinco na alimentação, sua concentração na peça intermediária, assim como sua participação na formação nuclear, durante os diferentes estágios da espermiogênese no touro.

## REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P.; HAMMERST, R. H.; VEERAMACHANENI, D. N. R. The epididymis and sperm maturation: a Perspective. **Animal Reproduction and Development**, v. 5, n. 4, p. 361-381, 1993.
- AMELAR, R. D.; DUBIN, L.; SCHOENFELD, C. Sperm motility. **Fertility and Sterility**, 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. **Biology and Reproduction**, v. 49, p. 166-175, 1993.
- BACCETTI B.; M. D.; BRUNI E.; GAMBERA L.; MORETTI E.; PIOMBONI P. An ultrastructural and immunocytochemical study of a rare genetic sperm tail defect that causes infertility in humans. **Fertility and Sterility**, v. 82, n. 2, p. 463-468, 2004.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.
- BLOM E.; WOLSTRUP C. Zinc as a possible causal factor in the sterilizing sperm tail defect, the "Dag defect", in Jersey bulls. In: INTERNATIONAL CONGRESS ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 8., 1976, **Proceeding...** 1976. p. 690-683.
- BOERSMA, A.; RABHOFER, R.; STOLLA, R. Influence of sample preparation, staining procedure and analysis conditions on bull sperm head morphometry using the morphology analyzer integrated visual optical system. **Reproduction Domestic Animals**, v. 36, p. 222-229, 2001.
- BOISSONNEAULT, G. Chromatin remodeling during spermiogenesis: a possible role for the transition proteins in DNA strand break repair. **FEBS Letters**, v. 5, n. 14, p. 111-114, 2002.
- CALVIN, H. I.; YU, C. C.; BEDFORD, J. M. Effects of epididymal maturation, zinc (II) and copper (II) on the reactive sulfhydryl content of structural elements in rat spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 81, p. 333-334, 1973.
- CHEMES H. E.; OLMEDO S. B.; CARRERE C.; OSES R.; CARIZZA C.; LEISNER M.; BLAQUIER J. Ultrastructural pathology of the sperm flagellum: association between flagellar pathology and fertility prognosis in severely asthenozoospermic men. **Human Reproduction**, v. 13, p. 2521-2526, 1988.
- CHIECO P.; DERENZINI M. The Feulgen reaction 75 years on. **Histochemistry Cell Biology**, v. 111, p. 345-358, 1999.
- DADOUNE, J. P. Morphogenesis, organization and abnormalities of the nucleus in human spermatozoa. **Pathology Biological**, v. 41, n. 3, p. 220-221, 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.
- FAVIER, A. E. The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. **Biological Trace Element Research**, v. 32, p. 363-382, 1992.
- 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, 2004. CD-ROM.
- FOOTE, R. 2003. Effect of processing and measuring procedures on estimated sizes of bull sperm heads. **Theriogenology**, v. 59, p. 1765-1773.
- HENKEL, R.; BITTNER, J.; WEBER, R.; HUTHER, F.; MISKA, W. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. **Fertility and Sterility**, v. 71, n. 6, p. 1138-1143, 1999.

- KASTEN F. H. The chemistry of Schiff's reagent. **International Review of Cytology**, v. 10, n. 1, p. 1-100, 1960.
- KVIST, U.; BJORNDHAL, L.; KJELLBERG, L. Sperm nuclear zinc, chromatin stability and male fertility. **Scandinavian Microscopy**, v. 1, p. 1241-1247, 1987.
- MANDAL, G. P.; DASS R. S.; ISORE, D. P.; GARG, A. K.; RAM, G. C. Effect of zinc supplementation from two sources on growth, nutrient utilization and immune response in male crossbred cattle (*Bos indicus*×*Bos taurus*) bulls. **Animal Feed Science and Technology**, v. 138, p. 1-12, 2007.
- MAZRIMAS, J. A.; CORZETT, M.; CAMPOS, C.; BALHORN, R. A corrected primary sequence for bull protamine. **Biochemica of Biophysica Acta**, v. 872, n. 1/2, p. 11-15, 1986.
- MORAES, S. S. **Importância da suplementação mineral para bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa, CNPQC, 2001. (Série Documentos n. 14).
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1996. **Nutrient requirements of beef cattle**: minerals. 7. ed. Washington: National Academic Press, 1998. p. 54-69.
- NOGUEIRA, E. MEYER, L. R. R.; DUARTE, A. A.; BIEHL, M. V.; GILBERTI, M.; MORAIS, M. G. Seminal parameters of bulls receiving protein/energy supplementation plus zinc and vitamin A during the dry period and beginning of the breeding season. In.: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Abstracts...** 1, Porto Seguro: CBRA, 2004. p. 190.
- OLIVEIRA, A. R. DE.; MORAIS, M. G.; MORAES, S. S.; FERNANDES, C. E.; ÍTAVO, L. C. V.; ABREU, U. G. P. Efeito de diferentes fontes e concentrações de zinco na mistura mineral sobre desempenho e características seminais de touros jovens criados em campo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 3, p. 465-477, 2007.
- OSTERMEIER, G. C.; SARGEANT, G. A.; YANDELL, B. S.; PARRISH, J. J. Measurement of bovine sperm nuclear shape using fourier harmonic amplitudes. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 584-594, 2001.
- PIMENTEL, C. A. Infertilidade no touro. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MÉNDEZ, M. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de ruminantes e eqüinos**. São Paulo: Varela, 2001. p. 382-399.
- 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 Element Research**, v. 7, n. 3, p. 193-205, 2000.
- SPRENCHEER, D. J. ; COE, P. H. Differences in bull spermograms using eosin-nigrosin stain, Feulgen 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. **Australian Journal of Agricultural 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.; THOMAS, C. M G.; MERKUS, J. M. W.; ZIELHUIS, G. A.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Male factor subfertility: possible causes and the impact of nutritional factors. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 435-442, 2000.

---

Protocolado em: 15 maio 2008. Aceito em: 21 out. 2008.