

VALORES DE ZINCO NO PLASMA SEMINAL E SORO SANGÜÍNEO DE BOVINOS PÚBERES DA RAÇA NELORE RELACIONADOS ÀS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS E DESENVOLVIMENTO REPRODUTIVO¹

MARIA MARINA UNANIAN, ANTÔNIO EMÍDIO DIAS FELICIANO SILVA² e MARGOT ALVES NUNES DODE³

RESUMO - O estudo estabeleceu o nível do Zn e fosfatase ácida e alcalina no plasma seminal em relação ao desenvolvimento reprodutivo em 13 machos da raça Nelore, desde os dez meses de idade até a puberdade, criados em pastagem de *Brachiaria brizantha*, recebendo sal mineralizado *ad libitum*. O desenvolvimento reprodutivo foi medido pela circunferência escrotal, características físicas do sêmen e concentração da testosterona no plasma sangüíneo. A concentração do Zn no plasma seminal mostrou uma alta variação individual (CV = 64%), situando-se entre 0,3 e 18,3 mcg/ml. Animais que alcançaram mais precocemente a puberdade possuíam maior quantidade de Zn seminal (P<0,001). Houve correlação entre o zinco seminal e a concentração de testosterona (P<0,001). Não houve correlação do nível do Zn seminal com as características físicas do sêmen. Os níveis das fosfatases do plasma seminal apresentaram correlação com vigor, motilidade e defeitos dos espermatozoides (P<0,001).

Termos para indexação: morfologia espermática, anomalias espermáticas, fosfatase ácida, fosfatase alcalina, testosterona.

ZINC LEVELS IN SEMINAL PLASMA AND BLOOD SERUM OF PUBESCENT NELORE CATTLE, IN RELATION WITH SPERM CHARACTERISTICS AND REPRODUCTIVE DEVELOPMENT

ABSTRACT - The levels of zinc and of acid and alkaline phosphatase in seminal plasma in relation to reproductive development in thirteen Nelore males from ten months of age until puberty, raised on *Brachiaria brizantha* pasture and receiving mineral salt *ad libitum* were determined. The reproductive development was determined through scrotal circumference, physical semen characteristics and blood testosterone concentration. The zinc concentrations showed a high individual variation (CV = 64%) with values between 0,3 and 18,3 mcg/ml. The animals who reached sooner the puberty had a higher zinc concentration (P<0,001). A correlation between zinc and blood testosterone level (P<0,001) was observed. The phosphatase levels were correlated with vigor, motility and sperm defects (P<0,001).

Index terms: spermatic morphology, spermatic anomalies, acid phosphatase, alkaline phosphatase, testosterone.

INTRODUÇÃO

O Zn encontra-se presente em vários tecidos e são várias as suas funções biológicas.

Nos machos, é importante pela sua participação na espermatogênese e na formação e desenvolvimento dos órgãos genitais e anexos.

A quantidade de Zn no sêmen e tecido genital varia muito entre e dentro de cada espécie animal. A mais alta concentração de Zn encontra-se no plasma seminal humano (Kavanagh 1983). Nos animais, são o testículo e o epidídimo que apresentam maior quantidade de Zn (Hidiroglou & Knipfel 1984).

A deficiência de Zn, leva à atrofia dos túbulos seminíferos, hipogonadismo (Miller et al. 1964, Underwood & Somers 1969), alta incidência de patologias espermáticas (Wallace

¹ Aceito para publicação em 21 de dezembro de 1990
Trabalho realizado no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, Campo Grande, MS.

² Méd.-Vet., Ph.D., EMBRAPA/Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual (UEPAE) de São Carlos, Caixa Postal 339, CEP 13560 São Carlos, SP.

³ Méd.-Vet., M.Sc., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), BR 262, Caixa Postal 154, CEP 79100 Campo Grande, MS.

& Calvin 1981) e mesmo azoospermia (Kavanagh 1983). Os defeitos de uma deficiência de Zn são muito mais acentuados em animais jovens - principalmente durante a fase púbere - do que em adultos (Hidiroglou & Knipfel 1984).

O nível de Zn, tanto em tecidos como em fluidos, indica o seu *status* no organismo. Ainda, em decorrência da ligação do Zn às metaloenzimas e às proteínas, estas, por sua vez, podem, de maneira indireta, constituir um meio de diagnóstico da presença deste elemento (Hurley & Doane 1989).

Através da concentração do Zn e da atividade enzimática no sêmen, pode-se determinar o funcionamento dos testículos e glândulas anexas. Estudos demonstraram existir uma correlação entre estes parâmetros e a mortalidade e percentagem de espermatozóides vivos (Roussel & Stalcup 1966), assim como as anomalias espermáticas, espermatozóides sem cabeça, defeitos de cauda e cabeça (Wallace & Calvin 1981, Silva et al. 1988).

Apesar da importância deste elemento na reprodução, em bovinos, dispõe-se de poucos dados sobre o seu teor e efeito sobre os órgãos genitais, principalmente nos animais criados extensivamente e em clima tropical, região pecuária frequentemente apontada como deficiente em minerais, particularmente em Zn.

Como a fertilidade do rebanho bovino de corte é baixa e constitui motivo de preocupação e estudos, acredita-se que o enriquecimento dos conhecimentos do efeito do micronutriente Zn na reprodução de machos poderá contribuir para esclarecer este problema.

Assim, foi proposto um estudo para tentar estabelecer o nível do Zn no plasma seminal, e, através de correlações com parâmetros que representam o funcionamento reprodutivo, a sua função. Espera-se, desta forma, poder auxiliar no manejo reprodutivo do gado, e mesmo diagnosticar a presença de alterações relacionadas a esse microelemento.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados treze bovinos machos da raça Nelore, a partir dos dez meses de idade, desmame, até a puberdade (março a novembro de 1988). Os animais foram criados em regime extensivo, no Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte, em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, em pastagem de *Brachiaria brizantha*, recebendo sal mineralizado nos cochos, a vontade. A fonte de Zn no sal foi o sulfato de Zn, utilizado na proporção de 3,3%, da mistura mineral (sal comum 50%; fosfato bicalcico 45%; sulfato de zinco 3,3%; sulfato de cobre 0,6%; sulfato de manganês 0,6%; sulfato de cobalto 0,008%; iodeto de potássio 0,008%), considerando as necessidades diárias de 25 mg/kg de matéria seca da dieta (National Research Council 1976).

De acordo com a idade em que os animais atingiram a puberdade foram considerados dois grupos: o G1, cuja puberdade foi atingida entre 507 e 560 dias, e o G2, entre 561 e 710 dias. Este período pré-púbere foi ainda dividido em função da época do ano em E1 de março a maio (outono), E2 de junho a agosto (inverno) e E3 de setembro a novembro (primavera).

De todos os animais foi coletado, quinzenalmente, o ejaculado através de eletroejaculação. Após a coleta, o material foi imediatamente centrifugado (1.000 rpm/15 min.) para obter o plasma seminal. Em uma parte do plasma foi analisada, imediatamente, a atividade enzimática (fosfatase ácida e alcalina) (Krause 1966). O restante foi estocado a -20°C para a análise do teor de Zn (Kavanagh 1985).

No dia da coleta do sêmen foi ainda amostrado o sangue, do qual foi obtido o soro por centrifugação (3.500 rpm/15 min.) e determinados os mesmos parâmetros do plasma seminal, o Zn (Unanian & Silva 1986) e as fosfatases (Bessey et al. 1946).

Mensalmente, foram medidos a circunferência escrotal (CE) e perímetro torácico (PT), e no sêmen, turbilhão (Turb), vigor (Vig), motilidade (Mot), volume do ejaculado (Vol), concentração (Conc), total de células no ejaculado (Ejac), defeitos maiores (Ma), menores (Me) e totais (Tot) dos espermatozóides. A concentração do hormônio testosterona também foi medida. Para esta medição foi coletado sangue três vezes ao dia (9 h - A, 12 h - B e 15 h - C). Ainda, mensalmente, foram anotados os dados climáticos: índice pluviométrico (Pluv), temperatura (Temp), umidade relativa do ar (Umid) e luminosidade (Lum).

Os resultados do plasma seminal, alvo principal do estudo, foram analisados quanto às médias, ao

valor máximo e mínimo e ao coeficiente de variação (CV). Estes dados foram correlacionados, com os do soro sanguíneo e das demais medições.

O conteúdo de Zn no plasma seminal foi também analisado em função da idade em que os animais atingiram a puberdade, do ano (grupos G1 e G2) e época (E1, E2 e E3) através da análise de variância pelas médias de mínimos quadrados obtidos a partir do modelo de análise em split-plot, utilizando o pacote SOC (EMBRAPA 1988).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os valores médios, mínimos e máximos e CV dos parâmetros estudados.

Os valores de Zn encontrados no plasma seminal situam-se entre os descritos por Cragle et al. (1958) e Pansard & Mies Filho (1981) em bovinos, e os de Dyrendahl (1954) em carneiros.

Embora os animais tenham sido mantidos nas mesmas condições, a concentração do Zn seminal apresentou uma alta variação individual (CV = 64%), fato observado também por Cragle et al. (1958), Masters & Somers (1980), Hidioglou & Knipfel (1984) e Pansard & Mies Filho (1981). O mesmo não pôde ser observado no sangue (CV = 30%).

Esta diferença de comportamento entre o nível do Zn seminal e sanguíneo, encontrada também por Miller et al. (1966), mostra que a capacidade de retenção deste elemento é dife-

rente de tecido para tecido. A disponibilidade e estabilidade do Zn nestes fluidos estão relacionadas às suas necessidades, que, no caso do sêmen, são muito maiores.

Ainda considerando que os componentes do sêmen são produzidas em diversas partes do genital masculino, é de se supor que o nível do Zn deve ser o reflexo do funcionamento destas partes, sendo vários os mecanismos metabólicos que se encontram envolvidos. Kavanagh (1985), após estudar a participação do Zn nas funções do genital masculino, afirmou ser este elemento muito mais importante para a reprodução do que para qualquer outra função orgânica, principalmente considerando a interligação da reprodução do que para qualquer outra função orgânica, principalmente considerando a interligação da reprodução com as demais funções. Isto poderia explicar a variação individual encontrada, ao mesmo tempo mostrando que os fatores intrínsecos exercem uma influência muito maior do que o meio ambiente, conforme se pode constatar também na Tabela 2.

Nesta Tabela observa-se que o nível do Zn no plasma seminal não variou em função da época do ano. Como o conteúdo do Zn no organismo depende da quantidade ingerida, e deveria existir diferença entre a época do inverno e as demais, - pois em cada uma destas épocas a disponibilidade de Zn nos alimentos se modifica, principalmente quando os animais são criados exclusivamente em pastagem -, e, a

TABELA 1. Concentrações médias (E.P.), valores mínimos e máximos, e C.V. (%) dos parâmetros Zn (mcg/ml), fosfatase ácida e alcalina (U/l) no plasma seminal, e soro sanguíneo de bovinos machos da raça Nelore, do desmame à puberdade.

Variáveis	Plasma Seminal						Soro Sanguíneo					
	Número de observações	Média	E.P.	Mínimo	Máximo	C.V.	Número de observações	Média	E.P.	Mínimo	Máximo	C.V.
Zinco	99	6,07	0,40	0,30	18,30	64	99	0,99	0,03	0,17	2,94	30
Fosfatase ácida	75	262,21	33,9	9,61	1.505,32	112	103	6,14	0,22	1,04	11,07	36
Fosfatase alcalina	78	106,75	14,56	4,49	676,38	120	110	44,14	1,72	14,48	98,60	41

E.P. = Erro-padrão

C.V. = Coeficiente de variação

fórmula do sal mineralizado não varia em função da disponibilidade dos minerais da pastagem, como neste estudo. O mesmo foi observado por Miller et al. (1966) trabalhando com tecido testicular.

Ainda na Tabela 3, não existe correlação do nível de Zn seminal com os dados climáticos. A sazonalidade no conteúdo de Zn foi encontrada por Masters & Somers (1980), porém no sangue. Como o conteúdo de Zn no sangue comporta-se de maneira diferente, não pode ser comparado ao Zn seminal.

O Zn tem sido freqüentemente apontado como essencial ao crescimento e funcionamento dos órgãos genitais e da atividade reprodutiva (Hidioglou 1979, 1980, Hurley & Doane 1989, Hidioglou & Knipfel 1984) o que parece resultar da comparação dos grupos G1 e G2 (Tabela 4). Se considerarmos o grupo G1 como o dos animais mais precoces, ou seja, dos que alcançaram mais rapidamente a puberdade, observa-se possuem estes uma maior quantidade de Zn no plasma seminal ($P < 0,001$). Estes resultados sugerem a existência de animais mais adaptados, que, dentro das mesmas condições de criação, responderam e se desenvolveram de maneira diferente.

TABELA 2. Análise de variância pelas médias de mínimos quadrados de Zn no plasma seminal, em relação à idade à puberdade e época do ano, de bovinos machos da raça Nelore, do desmame à puberdade.

Fonte de variação	GL	Média dos quadrados
Pub	1	141.4702*
Anim/Pub (Erro a)	11	16.1691
Época	2	18.9823
Pub x Época	2	2.2002
Resíduo (Erro b)	-	13.8791 (77)

* $p < 0,02$

Pub = idade à puberdade

Anim = animal

GL = grau de liberdade

A quantidade de Zn na dieta (25 mg/kg da matéria seca da dieta), mesmo usada de acordo com as recomendações do National Research Council (1976), parece ter influenciado o desenvolvimento reprodutivo de apenas parte

TABELA 3. Concentrações médias (E.P.) de Zn (mcg/ml), estimadas pelos mínimos quadrados do efeito da idade à puberdade no plasma seminal e soro sanguíneo de bovinos machos da raça Nelore, desde o desmame à puberdade, em relação à idade à puberdade.

Idade à puberdade	Número de animais	Zinco	
		Plasma seminal	Soro sanguíneo
G1	7	7,05a (0,56)	1,04a (0,05)
G2	6	4,51b (0,66)	0,94a (0,05)

Valores acompanhados de letras diferentes são significantes ao nível de $P < 0,02$ pelo teste de Tukey.

E.P. = Erro padrão

G1 = Idade à puberdade alcançada entre 507 a 560 dias

G2 = Idade à puberdade alcançada entre 561 a 710 dias

TABELA 4. Concentrações médias (E.P.) do Zn (mcg/ml), estimadas pelos mínimos quadrados do efeito da ano, no plasma seminal de bovinos machos da raça Nelore, do desmame à puberdade.

Época	Nº observações	Média	E.P.
E1 (outono)	33	5,77	0,67
E2 (inverno)	24	4,97	0,78
E3 (primavera)	37	6,60	0,62

E.P. = Erro padrão

E1 = Época 1, outono = março, abril, maio

E2 = Época 2, inverno = junho, julho, agosto

E3 = Época 3, primavera = setembro, outubro, novembro

dos animais, ou seja, dos menos exigentes. Ainda, considerando a quantidade de Zn usada na dieta mineral, esta foi muito abaixo da descrita por Underwood & Somers (1969), e mesmo por Hatch et al. (1987), em carneiros, como adequada para proporcionar um desenvolvimento máximo da função testicular.

Observando a quantidade de Zn no plasma seminal dos animais cuja puberdade se manifestou mais tardiamente, esta quantidade foi semelhante à descrita por Swarup & Sekhon (1976), 4,4 mcg/ml, como pertencente a touros com baixa fertilidade. Neste trabalho não se pode afirmar existir uma baixa fertilidade, porém um retardo no desenvolvimento reprodutivo.

O nível de Zn no plasma seminal apresentou uma correlação positiva significativa ($P < 0,001$) com o perímetro torácico (Tabela 3), que, indiretamente, representa o peso. Isto significa que animais menos pesados, com perímetro torácico menor, tiveram menor quantidade de Zn seminal. Observa-se, ainda, que estes mesmos animais, tiveram uma menor quantidade - embora não significativa - de zinco no sangue. Este fato poderá sugerir que, mesmo para o crescimento, o Zn ingerido não foi suficiente.

O nível do Zn seminal não apresentou correlação (Tabela 3) com a circunferência escrotal, que representou, ao longo do estudo, o crescimento testicular, como descrito por Underwood & Somers (1969) e Hatch et al. (1987). Também não foi observada correlação com as características físicas do sêmen como encontrado por Hidioglou & Knipfel (1984).

Uma correlação significativa ($P < 0,001$) foi observada entre o nível de Zn seminal e o de testosterona (Tabela 3), o que mostra a existência de uma participação deste elemento no metabolismo andrógênio, conforme descrito por Leathem (1970) e Kellokumpo & Rajaniemi (1981).

Apesar de os níveis de Zn seminal em animais considerados normais terem apresentado variações, tornando difícil o estabelecimento de valores de referência, a sua concentração

constitui valioso indicador de falhas reprodutivas causadas por deficiência de Zn (Kavanagh 1983, 1985; Miller et al. 1964). A sua importância para diagnóstico é ainda mais evidente, considerando-se a ausência de correlação com o nível sanguíneo (Tabela 3), que, existindo, poderia indicar o *status* seminal.

Por outro lado, o valor de 7,17 mcg/ml, encontrado nos animais mais precoces, poderia, pelo seu significado, ser sugerido como valor de referência. Nestes mesmos animais (G1), foi observada maior quantidade - embora não significativa - de Zn sanguíneo (Tabela 4).

Quanto à fosfatase ácida e alcalina (Tabela 1) no plasma seminal, os seus valores foram muito abaixo dos descritos por White (1958) e Mann (1964). No soro sanguíneo, no entanto, os resultados foram semelhantes aos observados por Hidioglou & Thomson (1980).

Os valores das fosfatases seminais foram correlacionados (Tabela 5) com os demais parâmetros observados no sangue e plasma seminal, para fins de diagnóstico.

Sabe-se que a atividade enzimática no organismo depende da presença do Zn (Hidioglou & Knipfel 1984; Hurley & Doane 1989). Kirchgessner et al. (1975) chegam a considerar a fosfatase alcalina um sensível indicador do *status* do Zn. No entanto, neste trabalho não foi possível estabelecer esta relação.

As fosfatases alcalina e, principalmente, a ácida, por predominar no sêmen de bovino, segundo Krause (1966), constituem parâmetros úteis na avaliação do sêmen no que diz respeito à densidade, ao volume, ao movimento progressivo dos espermatozoides e à viscosidade, fato também observado neste estudo (Tabela 3). Além da correlação existente entre as fosfatases e o vigor, a motilidade e, mesmo o turbilhão (no caso da fosfatase ácida), ainda foi constatada uma relação das fosfatases com os defeitos maiores e totais dos espermatozoides. Estes resultados permitem concluir para a possibilidade de usar a concentração das fosfatases alcalina e ácida para o diagnóstico de anomalias do sêmen, conforme descrito por Krause (1966).

TABELA 5. Correlações das concentrações médias do Zn, fosfatase ácida e alcalina no plasma seminal com os valores das médias corporais do sêmen, testosterona e dados climáticos, de bovinos machos da raça Nelore, do desmame à puberdade.

Variáveis seminais	Medidas do sêmen										Dados climáticos							
	CE	PT	TURB	VIG	MOT	VOL	CONC	EJAC	MA	ME	TOT	A	B	C	PLUV	TEMP	UMID	LUM
Zinco	0,131	0,304*	-0,1544	0,1126	0,0214	0,0739	-0,0436	-0,038	-0,1204	0,0474	-0,1648	0,4957*	-0,1155	0,2166	0,0874	0,0421	0,055	0,0757
Fosfatase ácida	-	-	0,1390*	0,3506*	0,2925*	0,1074	0,1614	0,0904	-0,3390*	-0,0024	-0,3219*	-0,1163	-0,0838	0,5546*	0,0508	0,2281	-0,3195*	-0,1926
Fosfatase alcalina	-	-	0,2186	0,3725*	0,3626*	0,0898	0,1122	0,0597	-0,4646*	0,1263	-0,4084*	0,0910	-0,0422	0,9644*	0,1114	0,3624*	-0,2966*	-0,1193

*	=	significante (P<0,01)	MA	=	Defeitos maiores
**	=	significante (P<0,001)	ME	=	Defeitos menores
CE	=	Circunferência escrotal	TOT	=	Defeitos totais
PT	=	Perímetro torácico	A	=	Níveis de testosterona da coleta das 9 h
TURB	=	Turbilhão	B	=	Níveis de testosterona da coleta das 12 h
VIG	=	Vigor	C	=	Níveis de testosterona da coleta das 15 h
MOT	=	Motilidade	PLUV	=	Índice pluviométrico
VOL	=	Volume	TEMP	=	Temperatura média mensal
CONC	=	Concentração	UMID	=	Umidade média mensal
EJAC	=	total de células no ejaculado	LUM	=	Luminosidade média mensal

Considerando o nível das fosfatases seminais e sanguíneas, ainda observa-se existir uma correlação significativa ($P < 0,001$) entre os níveis da fosfatase ácida no sangue e os da fosfatase alcalina e ácida no plasma seminal (Tabela 6). Isto demonstra que através da fosfatase ácida do sangue se poderia estabelecer a atividade das fosfatases seminais, o que, do ponto de vista de diagnóstico, é importante, pela facilidade de obtenção das amostras. Da mesma forma, não é necessária a determinação das duas fosfatases no plasma seminal, pois entre as duas existe uma correlação altamente significativa ($P < 0,001$), sendo suficiente determinar uma para se avaliar a qualidade do sêmen.

Além das correlações mencionadas foi observado existir uma correlação entre as atividades enzimáticas, ácida e alcalina com o nível hormonal. Ainda os níveis de fosfatase alcalina e ácida apresentaram correlações com a umidade, e a fosfatase alcalina, com a temperatura (Tabela 5), ao contrário do observado por Mohan Reddi & Raja (1980).

TABELA 6. Correlações entre as concentrações médias do Zn (mcg/ml), fosfatase ácida e alcalina (U/l) do plasma seminal e soro sanguíneo de bovinos machos da raça Nelore, do desmame à puberdade.

Variáveis	Plasma Seminal		Soro Sanguíneo		
	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina	Zinco	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
Zinco	0,09734	0,08064	-0,0224	0,1531	-0,0976
Fosfatase ácida		0,7329***	0,1432	0,3121*	0,0763
Fosfatase alcalina			0,1513	0,3448**	-0,0823

* $P < 0,05$
 ** $P < 0,01$
 *** $P < 0,001$

CONCLUSÕES

1. A concentração do Zn no plasma seminal de bovinos de dez meses de idade até a puberdade variou de 0,3 a 18,3 mcg/ml (CV = 64%).

2. Animais que alcançaram mais rapidamente a puberdade apresentaram maior quantidade de Zn no plasma seminal.

3. Os valores das fosfatases ácida e alcalina em bovinos de dez meses de idade até a puberdade podem mostrar a presença de alterações das características do sêmen.

4. As concentrações sanguíneas de Zn e fosfatases não indicam o *status* seminal destes parâmetros.

REFERÊNCIAS

- BESSEY, O.A.; LOWRY, O.H.; BROCK, M.J. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. **Journal of Biological Chemistry**, v.164, p.321-329, 1946.
- CRAGLE, R.G.; SALISBURY, G.W.; MUNTZ, J.H. Distribution of bulk and trace minerals in bull reproductive tract fluids and semen. **Journal of Dairy Science**, v.41, p.1273-1277, 1958.
- DYRENDAHL, I. Undersokningar rörande förekomsten av zink i tjursperma. **Nordisk Veterinärmedicin**, v.5, p.873-878, 1954.
- EMBRAPA. Núcleo Tecnológico para Informática Agropecuária (Campinas, SP). **Manual do usuário SOC**. Campinas, 1988. Paginação irregular.
- HATCH, P.A.; SPEARS, J.W.; GOODE, L.; JOHNSON, B.H. Influence of dietary zinc on growth and testicular development in ram lambs fed a high fiber diet. **Nutrition Reports International**, v.35, n.6, p.1175-1183, 1987.
- HIDIROGLOU, M. Trace element deficiencies and fertility in ruminants: a review. **Journal of Dairy Science**, v.62, n.8, p.1195-1206, 1979.
- HIDIROGLOU, M. Zinc, copper and manganese deficiencies and the ruminant skeleton: a review. **Canadian Journal of Animal Science**, v.60, n.3, p.579-590, 1980.
- HIDIROGLOU, M.; KNIPFEL, J.E. Zinc in mammalian sperm: a review. **Journal of Dairy Science**, v.67, n.6, p.1147-1156, 1984.
- HIDIROGLOU, M.; THOMPSON, B.K. Serum alkaline phosphatase activity in beef cattle. **Annale de Recherche Vétérinaire**, v.11, n.4, p.381-389, 1980.
- HURLEY, W.L.; DOANE, R.M. Recent development in the roles of vitamins and minerals in reproduction. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.3, p.784-804, 1989.
- KAVANAGH, J.P. Sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, citrate and chloride content of human prostatic and seminal fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.68, p.359-363, 1985.
- KAVANAGH, J.P. Zinc binding properties of human prostatic tissue, prostatic secretion and seminal fluid. **Journal Reproduction and Fertility**, v.68, p.359-363, 1983.
- KELLOKUMPO, S.; RAJANIEMI, H. Effect of zinc on the uptake of human chorionic gonadotropin (hCG) in rat testes and testosterone response *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.24, p.298-308, 1981.
- KIRCHGESSNER, M.; SCHWARZ, W.A.; ROTH, H.P. Zur aktivitaet der alkalische phosphatase in serum und knochen von zinc-depletierten un replierten kuhen. 16. Mitteilung. **Zeitschrift Tierphysiologie, Tierernahrung und Futtermittelkde**, v.35, p.191-200, 1975.
- KRAUSE, D. **Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der Fertilitaets Diagnostischen Bedeutung der Befunde**. Hannover: Tierärztliche Hochschule, 1966. 165p. Tese de Livre Docência.
- LEATHAM, J.H. Nutrition. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, M.R.; VAN DEMARK, N.L. **The testis**. New York: Academic Press, 1970. v.3, 193p.
- MANN, T. **The biochemistry of semen and of the male reproductive tract**. New York: John Wiley & Sons, 1964. 82p.

- MASTERS, D.G.; SOMERS, M. Zinc status of grazing sheep: seasonal changes in zinc concentrations in plasma, wool and pasture. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, v.20, n.2, p.20-24, 1980.
- MILLER, W.J.; BLACKMON, D.M.; CENTRY, R.P.; POWELL, G.W.; PERKINS, H.F. Influence of zinc deficiency on zinc and dry matter content of ruminant tissues and on excretion of zinc. **Journal of Dairy Science**, v.49, n.11, p.1446-1453, 1966.
- MILLER, W.J.; PITTS, W.J.; CLIFTON, C.M.; SCHMITTLE, S.C. Experimentally produced zinc deficiency in the goat. **Journal of Dairy Science**, v.47, n.5, p.556-558, 1964.
- MOHAN REDDI, N.; RAJA, C.K.S.V. Seasonal variations in acid alkaline phosphatase contents in Surti buffalo bull semen. **Kerala Journal of Veterinary Science**, v.11, n.1, p.48-50, 1980.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Subcommittee on beef cattle nutrition. **Nutrient requirement of beef cattle**. 5.ed. Washington: National Academy of Science, 1976. 56p. (Nutrient requirements of domestic animals, 4).
- PANSARD, N.T.; MIES FILHO, A. Teor de zinco no plasma seminal, soro sanguíneo e características do sêmen de reprodutores *Bos indicus* (Lin.). **Arquivos de Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.9, p.55-67, 1981.
- ROUSSEL, J.D.; STALCUP, O.T. Influence of age and season on phosphatase and transaminase activities in blood serum of bulls. **American Journal of Veterinary Research**, v.27, p.1527-1539, 1966.
- SILVA, A.E.D.F.; DODE, M.A.N.; UNANIAN, M.M. The establishment of puberty in Zebu bulls of the Nellore breed raised in Central Brazil. In: WORLD CONGRESS ON SHEEP AND BEEF CATTLE BREEDING, 3., 1988, Paris. **Proceedings**. . . Paris: INRA, 1988. v.2, p.713-716.
- SWARUP, D.; SEKHON, H. Correlation of vitamin A and zinc concentration of seminal plasma to fertility of bovine semen. **Nutrition Reports International**, v.13, n.1, p.37-42, 1976.
- UNANIAN, M.M.; SILVA, A.E.D. Valores bioquímicos no soro de cabras relacionadas ao estudo fisiológico e raça, no Nordeste semi-árido. III. Zinco e cobre. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.5, p.541-546, 1986.
- UNDERWOOD, E.J.; SOMERS, M. Studies on zinc nutrition in sheep. I. The relation of zinc to growth, testicular development and spermatogenesis in young rams. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.20, p.889-897, 1969.
- WALLACE, E.; CALVIN, H.I. Effects of zinc deficiency on the development of rat spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.24, p.81a, 1981. Supplement.
- WHITE, I.G. Biochemical aspects of mammalian semen. **Animal Breeding Abstracts**, v.26, n.2, p.109-123, 1958.