



43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia
24 a 27 de Julho de 2006
João Pessoa - PB

ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA CABEÇA ESPERMÁTICA E PREVALÊNCIA DE CONDENSAÇÃO ANORMAL DA CROMATINA EM TOUROS NELORE COM DEFICIÊNCIA DE ZN NA DIETA

PAULA DE ALMEIDA B MIRANDA(1), CARLOS EURICO FERNANDES(2), SHEILA DA SILVA MORAES(3), ALEXANDRA ROCHA DE OLIVERIA(3), SIMONE DA CUNHA P LOPES(3), THAIS BASSO AMARAL(3), MARIA PAULA F FIALHO(1)

(1)Mestrandas em Nutrição Animal pela UFMG;

(2)Curso de Medicina Veterinária, UCDB, Av. Tamandaré, 6000, Jd. Seminário, 79117-900;

(3)Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

RESUMO

Estudos desenvolvidos na Embrapa Gado de Corte revelaram alterações na função imunológica e reprodutiva em bezerros filhos de vacas Nelore com deficiência de Zn na suplementação mineral. Especificamente na função reprodutiva, o Zn participa da estruturação da cromatina nuclear, multiplicação e diferenciação dos espermatozoides, na maturação epididimal, além de atuar como co-fator no metabolismo endócrino. Com base na avaliação seminal quinzenal a partir dos 18 meses de idade, comparou-se diferentes medidas morfométricas da cabeça espermática e correlacionou-se com índices de condensação anormal da cromatina nuclear de touros criados a campo e que foram submetidos a níveis diferentes de Zn na dieta (T1, n=4, 0 mg/kg/dia e T2, n=2, 60 mg/kg/dia). Os touros do T1 apresentaram percentuais inferiores de espermatozoides morfologicamente normais e de motilidade, e superiores de defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda. As medidas de comprimento (μm), largura inferior (μm) e área total (μm^2) foram superiores ($p < 0,01$) nos touros do T1 em relação ao controle (T2). As correlações estabelecidas sugerem que há tendência das alterações de cromatina estarem presentes em maior percentual em touros com alterações nas medidas morfométricas da cabeça espermática. Desta forma, touros com deficiência de Zn na dieta podem sofrer alterações na morfometria da cabeça espermática e, por consequência, estarem mais susceptíveis a alterações na cromatina nuclear.

PALAVRAS-CHAVE

deficiência, cabeça espermática, morfometria, touros jovens, zinco

MORPHOMETRY ANALYSIS OF SPERM HEAD AND ABNORMAL CHROMATIN CONDENSATION PREVALENCE IN NELORE BULLS UNDER ZN DEFICIENCY IN DIET

ABSTRACT

Studies from Embrapa, Campo Grande, MS, Brazil, revealed alterations in the immunological and reproductive function of Nelore calves born from cows receiving mineral supplementation deficient in Zn.

The role of Zn on the reproductive function is related to the structuring of the nuclear chromatin, the multiplication and differentiation of spermatides, the epididymal maturation, besides acting as co-factor in the endocrine metabolism. Seminal parameters, including sperm heads morphometric measurements, were evaluated in 18 months Nelore bulls. These results were compared and correlated with abnormal

condensation of the nuclear chromatin indexes. The bulls were submitted to different levels of Zn in the diet (T1, n=4, 0 mg/kg/dia and T2, control, n=2, 60 mg/kg/dia). The bulls of T1 presented lower percentile of morphological normal sperm and motility, and higher head and intermediate piece and tail defects. The length (μm), inferior width (μm) and total area (μm^2) measures were higher ($p < 0,01$) in the T1, in relation to the control (T2). The established correlations suggest that there is a tendency of chromatin alterations to be higher in bulls with alterations in the morphometric measures of sperm head. Afterwards, diets deficient in Zn may cause alterations in the morphometry of the sperm head, resulting in major susceptibility to alterations in the nuclear chromatin in bulls.

KEYWORDS

deficiency, sperm head, morphometry, young bulls, zinc

INTRODUÇÃO

Durante a puberdade, touros criados a campo e mantidos com suplementação deficiente em Zn mostraram altos percentuais de defeitos morfológicos provenientes da espermiogênese, dentre esses, alterações de cabeça, e peça intermediária (Moraes et al. 2004). Segundo Denny & Ashworth (1991) a transcrição de proteínas no núcleo espermático depende da expressão de genes da família Zfp-29, cuja função primordial é a compactação da cromatina e envelope nuclear. Este fenômeno é fundamental para a manutenção da estabilidade do DNA, juntamente com o formato, contorno e organização estrutural da cabeça do espermatozóide. Assim, variações no formato da cabeça espermática refletem modificações na seqüência destes eventos e, muito provavelmente, são marcadores de anormalidades diretas na cromatina ou na matriz nuclear (Ostermeier et al., 2000). Neste contexto, os métodos que exploram as medidas da cabeça espermática têm sido amplamente utilizados e tornam-se úteis na estimativa da variação da forma e, indiretamente, do conteúdo nuclear. Dentre as variáveis mais usadas, destacam-se a área, comprimento, largura, na maior curvatura, próxima à região equatorial da célula, e largura inferior, que reflete a inserção da peça intermediária (Sailer et al., 1996; Foote, 2003).

Este estudo teve como objetivo avaliar os padrões morfométricos da cabeça espermática em touros com e sem deficiência de Zn na dieta.

MATERIAL E MÉTODOS

Bezerros Nelore (n=6) foram desmamados com idade entre 6 e 7 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 dois tratamentos e receberam, diariamente, mistura mineral com ou sem zinco (Zn) em sua fórmula, distribuídos em dois tratamentos: T1 (n=4) sem Zn e T2 (n=2, controle) com 60mg/kg/dia de Zn (dobro das recomendações do NRC,1996). A partir dos 18 meses de idade, os tourinhos foram submetidos a exame andrológico quinzenalmente, durante um ano, para acompanhamento da maturidade sexual e monitoramento da qualidade seminal.

Para fins deste experimento, após a colheita, foram feitos esfregaços de sêmen que, após fixação, eram corados com solução de rosa bengala 3% em água destilada. Em seguida as lâminas eram secas em ambiente e guardadas para futura análise. As análises morfométricas foram feitas sob imersão, em microscopia de campo claro. Para a determinação dos percentuais de condensação anormal da cromatina, utilizou-se a coloração de Fielgen. Esfregaços de sêmen foram embebidos em solução de ácido clorídrico 5N por 30 minutos e em seguida, após rápida lavagem com água destilada, mergulhados em reativo de Schiff 5N por trinta minutos. Posteriormente, eram lavados em água corrente por cinco minutos e, após secar, mergulhados em solução de ácido periódico de Schiff (PAS) a 0,8%, por trinta minutos. Após nova lavagem em água corrente, os esfregaços eram secos na temperatura ambiente. A leitura foi feita em microscopia de contraste de fase em imersão (1000x), estimando-se em 200 espermatozóides, o percentual de formas com cromatina anormal, ou seja,

aquelas que apresentavam a formação de vacúolos, descoradas (tipo “fantasma”) ou com halos claros na região nuclear.

Considerou-se a mensuração de 30 células/lâmina escolhidas ao acaso de cada ejaculado, sendo que dessas, seis tinham defeitos de cabeça, seis com defeito de cauda, seis com defeito de peça intermediária 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: área = [(largura superior (B) + largura inferior(C))/2 x comprimento(A)].

A análise de variância, modelo linear (tratamento fixo), teste t, foi usada para verificar o efeito de tratamento (com ou sem Zn) sobre as diferentes medidas da cabeça espermática, considerando os defeitos de cabeça, peça intermediária e células morfolologicamente normais. Os percentuais de cromatina anormal foram correlacionados (Pearson, $p < 0,05$) com as medidas obtidas em cada ejaculado dentro de cada tratamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferenças encontradas na morfometria da cabeça espermática foram expressas nas distintas medidas aplicadas (Figura 1). Com exceção da largura superior, as demais medidas foram diferentes ($p < 0,01$) entre espermatozoides morfolologicamente normais, supostamente sem alterações de núcleo e para aqueles com defeitos de cabeça e peça intermediária. A área (mm²) da cabeça espermática apresentou a maior diferença entre os tratamentos, possivelmente por representar a magnitude das diferenças do comprimento e largura inferior. Isso sugere que mecanismos envolvidos na organização e formação do núcleo espermático estejam envolvidos nas alterações observadas. Durante a segunda metade da espermiogênese, o núcleo das espermátides sofre profundas transformações reconfigurando a matriz nuclear, decorrente da mudança do formato esférico para o alongado, único e característico para cada espécie. Neste momento, a compactação da cromatina 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). 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 espermatozoides com maior largura superior e menor largura inferior, formato encontrado para aquele encontrado nos touros do T2.

Embora as correlações estabelecidas na Tabela 1 foram baixas, revelaram que para os touros do tratamento 1 (sem Zn) apenas a largura superior é mais importante na variação dos percentuais de cromatina anormal ($r = 0,18$, $p < 0,01$). Nos touros do tratamento 2, a área e o comprimento foram mais importantes, mostrando que a medida que aumenta a prevalência de anormalidades na cromatina há tendência no aumento da área e comprimento da cabeça espermática. Em touros com processo degenerativo de caráter irreversível, correlações entre morfometria e espermatozoides com cromatina anormal, 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 suplementação mineral de touros pode caracterizar 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 deficiência de zinco estão sujeitos a apresentarem defeitos específicos em maior frequência. Esses resultados indicam a necessidade de pesquisas sobre o nível de zinco na alimentação, sua formação na estrutura da cabeça espermática e, ainda, sua concentração na peça intermediária, assim como sua participação na formação nuclear durante os diferentes estágios da

espermiogênese no touro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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. 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.

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

MORAES, S. S.; Nicodemo, M. L. F.; Vaz, E. C.; Pires, P.P.; Catanante, M.C.; erto Lopes de S.Thiago, L.R.L.de; Vieira, J. M.; Fonseca, E. M. 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.

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.