

Artículo Original. Septiembre-Diciembre 2016; 6(3):24-34. Recibido: 27/08/2016. Aceptado: 06/10/2016.

<http://dx.doi.org/10.21929/abavet2016.63.2>

Response to the additional intake of different levels of organic zinc on the seminal quality of hair lambs

Respuesta al consumo adicional de zinc orgánico en la calidad seminal de ovinos de pelo

Rodríguez-Gaxiola Miguel m_angel2412@hotmail.com, **Romo-Valdez Juan**

romo_14@hotmail.com, **Ortiz-López Briceida** brithy18@hotmail.com, **Barajas-Cruz Rubén**

rubar@uas.edu.mx, **Gaxiola-Camacho Soila** soilagaxiola2@gmail.com, **Romo-Rubio Javier***

romo60@uas.edu.mx

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa; Boulevard San Ángel s/n, Colonia San Benito, Culiacán, Sinaloa, México, CP 80246. Autor responsable y de correspondencia: romo60@uas.edu.mx

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la respuesta al consumo adicional de diferentes niveles de zinc orgánico en la calidad seminal de ovinos de pelo, se utilizaron 9 borregos prepúberes (entre los 3 ½ a 4 ½ meses de edad) con un peso promedio de 13 kg, los cuales fueron asignados a uno de tres tratamientos en un diseño experimental completamente al azar. Los tratamientos consistieron: 1) Testigo (T; n = 3), los borregos recibieron una dieta a base de maíz-soya-forraje, sin adición de zinc (Zn); 2) ZnMet35, dieta testigo más la adición de 35 ppm de Zn a partir de metionina de Zn (ZnMet) y 3) ZnMet70, dieta testigo más la adición de 70 ppm de Zn. La investigación se llevó a cabo entre los meses de julio de 2009 a abril de 2010. El consumo de dietas adicionadas con 70 ppm de Zn elevó ($P < 0.05$) el volumen del eyaculado (0.9696 vs. 0.7773 y 0.6864 mL) y la cantidad total de espermatozoides por eyaculado (1955.9 vs. 1463 y 1301.1 millones), mejoró ($P < 0.05$) el porcentaje de espermatozoides con morfología normal (92.870 vs. 89.045 y 86.818%) y elevó ($P = 0.09$) la concentración plasmática de testosterona (403.87 vs. 332.12 y 264.59 ng/dL) respecto de los borregos que consumieron dietas adicionadas con 35 ppm de Zn orgánico y los del grupo testigo, respectivamente. Se concluye que el consumo adicional de 70 ppm de Zn a partir de ZnMet eleva el volumen, la cantidad y calidad de espermatozoides del eyaculado, así como la concentración plasmática de testosterona en ovinos de pelo criados en condiciones subtropicales.

Palabras claves: zinc, calidad seminal, borregos.

ABSTRACT

With the objective to evaluate the response of additional intake of different levels of organic zinc on the seminal quality of hair lamb, nine prepubertal lambs were used (between 3.5 to 4.5 months of age) with an average weight of 13 kg and assigned to one of three treatments in an experimental design completely randomized. The treatments consisted on 1) Control (C; n = 3); the lambs received a diet from corn-soybean meal-forage, without addition of organic zinc (Zn); 2) ZnMet35, control diet plus addition of 35 ppm zinc from Zn methionine (ZnMet); and 3) ZnMet70, control diet plus addition of 70 ppm Zn. The investigation was carried out between July 2009 and April 2010. The consumption of the diet supplemented with 70 ppm organic Zn raised the seminal volume ($P < 0.05$), (0.9696 vs. 0.7773 y 0.6864 mL), and the total of spermatozoa per ejaculation (1955.9 vs. 1463 and 1301.1 millions), improved ($P < 0.05$) the percentage of spermatozoa with normal morphology (92.870 vs. 89.045 and 86.818 %), as well as the plasmatic concentration of testosterone (403.87 vs. 332.12 and 264.59 ng/dL; $p = 0.09$) respect to the treatments that received a diet supplemented with 35 ppm of organic Zn, and the control group, respectively. It is concluded, that consumption of diet supplemented with 70 ppm of Zn from ZnMet, raises the ejaculated volume, quantity, quality of spermatozoa, and raises the plasmatic concentration of testosterone, in hair lambs breeding in the subtropical zone.

Keyword: zinc, seminal quality, lamb.

INTRODUCCIÓN

El zinc es un elemento traza que interviene en más de 2700 enzimas, principalmente con funciones catalíticas en el 70% de los casos; también es parte estructural, actúa como sustrato o como regulador de la actividad enzimática (Andreini y Bertini, 2012); presenta características antioxidantes (Bray y Bettger, 1990; Zago y Oteiza, 2001), protegiendo al esperma, al igual que a otras células, contra el daño oxidativo y la oxidación de lípidos, inhibiendo la fosfolipasa (Eggert *et al.*, 2002), mejorando la calidad espermática (Rolf *et al.*, 1999).

La producción de espermatozoides pasa por muchas divisiones celulares y esto requiere grandes cantidades de zinc, ya que está involucrado en el metabolismo del ácido nucleico y de las proteínas, por lo que es esencial en la diferenciación y replicación celular (Underwood, 1981). En los túbulos seminíferos activa y mantiene el epitelio germinativo (Wong *et al.*, 2002); ayuda a codificar los factores de transcripción involucrados en la espermatogénesis (Bedwal y Bahuguna, 1994). En la motilidad espermática controla la utilización de la energía por el sistema del ATP (El-Masry y Kamal, 1994). Además es esencial en la producción de muchas hormonas sexuales, incluyendo la testosterona, gonadotropinas y hormonas relacionadas (Hambidge *et al.*, 1986; Wong *et al.*, 2002).

El presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar la respuesta al consumo adicional de diferentes niveles de zinc orgánico en la calidad seminal de ovinos de pelo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental. El trabajo se realizó en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa, ubicada en el municipio de Culiacán, Sinaloa. Se utilizaron 9 machos ovinos de pelo, pre púberes (entre los 3 ½ a 4 ½ meses de edad), con un peso promedio de 13 kg, los que fueron asignados a uno de 3 tratamientos en un diseño experimental completamente al azar. Los tratamientos consistieron en: 1) Testigo (T; n = 3); los borregos recibieron una dieta a base de maíz-soya-forraje (Cuadro 1) sin adición de zinc; 2) ZnMet35 (n = 3); dieta similar al testigo más la adición de 35 ppm de Zn a partir de metionina de zinc (^{MR}Zipro Corporation); y 3) ZnMet70 (n = 3); dieta similar al testigo con adición de 70 ppm de Zn a partir de metionina de zinc (ZnMet). Los animales se alojaron en tres corrales totalmente techados, cada corral alojó a 3 animales; tuvieron acceso permanente a agua de bebida. El alimento se dio en dos porciones (mañana y tarde).

A la llegada de los animales se tomaron muestras de sangre y de excremento para determinar la presencia o no de hemoparásitos y parásitos gastrointestinales. Los animales recibieron tratamiento farmacológico, con Albendazol (0.075 gr/animal) y Doramectina (5 mg/animal) como tratamiento contra parásitos; fueron vacunados contra *Clostridium* y *Haemophilus*; se les aplicó vitamina ADE (.5 mL/animal; 250 000 UI de

vitamina A, 37 000 UI de vitamina D3 y 25 UI de vitamina E), minerales y aminoácidos esenciales (5mL/animal). Tuvieron un periodo de adaptación de 15 días.

Mediciones: después del periodo de adaptación los animales recibieron la dieta alimenticia, de acuerdo al tratamiento asignado; en el día 1 (inicio) del experimento se midió la circunferencia escrotal, y posteriormente, ésta se realizó mensualmente. También se tomó una muestra sanguínea a cada borrego de los diferentes tratamientos, para medir los niveles de testosterona y los muestreos posteriores se realizaron cada mes. Las muestras de sangre, se tomaron por punción en la vena yugular.

El entrenamiento de los borregos para la eyaculación en vagina artificial se comenzó al inicio de la pubertad, alrededor de los 5 meses de edad, de acuerdo a lo recomendado por Méndez *et al.* (2005).

Entre los meses de marzo y abril de 2010, se tomaron muestras seminales semanalmente a cada uno de los borregos en estudio. En el semen recolectado se midieron los siguientes parámetros: volumen del eyaculado, concentración espermática, motilidad espermática, viabilidad espermática y morfología.

Recolección seminal. La técnica utilizada para la recolección seminal fue por medio de vagina artificial tipo francesa, la cual en su interior tuvo una temperatura de 40-42°C; el semen se contuvo en un tubo graduado de 10 mL (I.M.V. Technology); inmediatamente después de tener la muestra se colocó en una plantilla caliente a 37°C (Minitube^R).

Evaluación seminal

Volumen. El volumen del eyaculado se midió directamente en el tubo de recogida, de acuerdo a lo propuesto por Aisen (2004).

Motilidad en masa. Se determinó colocando una gota de semen en un portaobjeto (Pearl 25.4 x 76.2 mm) limpio y temperado a 37°C; y observándose con un aumento de 40x, de acuerdo con Mellishon y Gallegos (2006). Se realizó un estimado subjetivo de la motilidad basándose en el vigor de las ondas y su actividad; se cuantificó en una escala de 6 puntos (0 = sin movimiento a 5 = ondas vigorosas), según lo propuesto por Evans y Maxwell (1990).

Motilidad individual. Se determinó colocando una gota del diluyente y una gota pequeña de semen fresco en un portaobjeto templado a 37°C, para posteriormente homogeneizarlas; colocando un cubre-objeto y observando con un aumento de 100x. Se observaron varios campos sobre la laminilla y se determinó el porcentaje de espermatozoides que mostraron movimiento rectilíneo progresivo; los espermatozoides que giraron en círculo o avanzaron en forma oscilatoria, fueron considerados con movimientos anormales (Mellishon y Gallegos, 2006).

Concentración espermática. El conteo espermático se realizó por medio del método de fotocolorímetro, utilizando un fotómetro marca Spermacue.

Viabilidad y morfología. Para determinar el porcentaje de espermatozoides vivos y muertos, así como la morfología, se utilizó la técnica de tinción eosina-nigrosina de acuerdo a lo descrito por Evans y Maxwell (1990).

Toma de muestra sanguínea. Las muestras sanguíneas se tomaron por punción yugular, utilizando tubos estériles sin anticoagulantes (Tyco healthcare group), y agujas para sistema bacutainer de roscado (Venojet, 0.8 x 40 mm). Para separar el plasma, las muestras de sangre fueron centrifugadas (centrifuga C-600, SOL-BAT S.A.), por 15 minutos a 1500 rpm; el plasma se depositó en micro tubos y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Determinación de la concentración plasmática de testosterona. Las muestras de plasma fueron enviadas al laboratorio de reproducción de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, donde se determinó la concentración plasmática de testosterona, utilizando la técnica de radio-inmuno-análisis en fase sólida, con un kit comercial (TKTT-2).

Medición de la circunferencia escrotal. La circunferencia escrotal se midió cada mes, utilizando una cinta métrica en la región de mayor circunferencia de ambos testículos (Méndez *et al.*, 2005); cada una de las mediciones fue registrada.

Análisis estadístico. A los datos numéricos se les aplicó un análisis de varianza para un diseño completamente al azar (Steel y Torrie, 1985), utilizando el módulo de análisis de Varianza/covarianza del procedimiento para Modelos Lineales Generales de la Versión 8, del Paquete Estadístico Statistix®, se fijó un alfa máximo de 0.05 para aceptar diferencia estadística y se consideró a cada borrego como la unidad experimental. El modelo matemático utilizado fue: $Y_{ijk} = M_j + T_j + \epsilon_{ijk}$; donde: Y_{ijk} = variable de respuesta, M_j = media general de la característica estudiada, T_j = Efecto de los diferentes niveles de zinc y ϵ_{ijk} = error experimental o aleatorio.

Cuadro 1. Composición de dieta (BH) proporcionada a los borregos durante el experimento.

Ingredientes	Inclusión en base humedad (Kg)	
	Base húmeda	Base seca
Rastrojo de maíz	15.0	15.14
Maíz	59.2	59.72
Pasta de soya	18.5	18.67
Melaza de caña	6.0	5.05
Acid- Phos ¹	0.5	0.53
Piedra caliza	0.8	0.89
Total	100 %	100%
Análisis Calculado (en base seca) ²		
Proteína cruda %		13.66
Energía neta de mantenimiento. Mcal/Kg.		1.907
Calcio %		0.50
Fósforo %		0.34
Zinc mg/Kg		19.66

¹Acid-Phos^{MR} (Técnica Mineral Pecuaria, S.A. de C.V.) Premezcla preventiva para problemas de urolitiasis. ²Calculado en base a valores publicados (NRC, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El consumo de dietas adicionadas con 70 ppm de zinc elevó ($P < 0.05$) el volumen del eyaculado (0.9696 vs. 0.7773 y 0.6864 mL) y la cantidad total de espermatozoides por eyaculado (1955.9 vs. 1463 y 1301.1 millones), mejoró ($P < 0.05$) el porcentaje de espermatozoides con morfología normal (92.870 vs. 89.045 y 86.818 %) y elevó ($P = 0.09$) la concentración plasmática de testosterona (403.87 vs. 332.12 y 264.59 ng/dL). Respecto de los borregos que consumieron dietas adicionadas con 35 ppm de zinc orgánico y los del grupo control respectivamente; la información resumida se presenta en el Cuadro 2.

La respuesta observada por el consumo adicional de diferentes niveles de Zinc orgánico durante un periodo de 9 meses, indican que el consumo de dietas adicionadas con 70 ppm de zinc a partir de metionina de zinc elevan el volumen del eyaculado ($P < 0.05$) y la concentración sérica de testosterona ($P < 0.09$); estos resultados son similares a los reportados por Kumar *et al.* (2006) quien al utilizar dietas adicionadas con 0, 35 y 70 ppm de zinc a partir de sulfato de zinc y 35 ppm de propionato de zinc, observó que a medida que se incrementó el nivel de adición de zinc a las dietas ofrecidas a toros cruzados, se obtuvo un mayor volumen de eyaculado y concentración sérica de testosterona en comparación con el control. También, Cupic *et al.* (1998), observó un incremento en el volumen del eyaculado, cuando se suplementó con sulfato de zinc en la dieta de toros. Sin embargo estos resultados no coinciden con los encontrados por Luque *et al.* (2009), quien al suplementar metionina de zinc durante 5 meses a ovinos previos a la evaluación seminal, bajo condiciones climáticas similares a las de este estudio; no observaron modificaciones en el eyaculado. Desde el punto de vista fisiológico el Zn es calificado

como un micronutriente crítico, que posee propiedades multifuncionales en el organismo. En el sistema reproductivo del macho, existe en altas concentraciones y participa en el funcionamiento normal de testículos, próstata y epidídimo (García-Contreras *et al.*, 2011). En los testículos, el Zn se encuentra principalmente en las células de Leydig (CL), espermatogonias tipo B, y en las espermátidas (Croxford *et al.*, 2011). Las CL ocupan aproximadamente el 50% del compartimiento intertubular del testículo, por lo que el consumo de Zn es fundamental (Almeida *et al.*, 2006) para el adecuado funcionamiento testicular.

El retículo endoplasmático liso (REL), es el orgánulo citoplásmico más notable de las CL, por ser el lugar de acción de una serie de enzimas que intervienen en la síntesis de testosterona; donde el Zn favorece dicha síntesis (Hesketh, 1982). También se ha reportado que el zinc estimula el crecimiento y el desarrollo de órganos sexuales primarios, secundarios y accesorios en borregos; además se ha observado atrofia de éstos cuando los borregos son alimentado con dietas deficientes en zinc (Martin *et al.* 1994). La principal fuente de zinc en el semen es la próstata, donde hay altas concentraciones de este micromineral, y es el principal indicador de la función prostática (Elzanaty *et al.* 2004; Nagamine *et al.* 1990).

Cuadro 2. Efecto del consumo adicional de diferentes niveles de zinc orgánico, la calidad seminal, concentración sérica de testosterona y desarrollo testicular en ovinos de pelo.

Variable	Tratamientos			EEM ¹	Valor de P
	I Testigo	II 35 ppm ZnMet	III 70 ppm ZnMet		
Semental, n	3	3	3		
Muestra seminal, n	22	22	23		
Volumen, mL	0.6864 ^b	0.7773 ^b	0.9696 ^a	0.0399	0.05
Espermatozoides totales por colección, mill.	1301.1 ^b	1463.0 ^{ab}	1955.9 ^a	131.49	0.05
Concentración, millones/mL	1997.5	1777.5	1932.8	99.322	0.66
Motilidad individual, %	75.909	76.636	79.087	1.8699	0.77
Motilidad masal, escala de 0-5	3.6591	3.5909	3.7174	0.1408	0.93
Viabilidad, %	79.00	81.500	85.609	2.1560	0.45
Morfología normal, %	86.818 ^b	89.045 ^{ab}	92.870 ^a	1.1545	0.05
Circunferencia escrotal inicial, cm	17.167	16.667	17.5	0.9497	0.95
Circunferencia escrotal final, cm	28.667	27.333	28.333	0.7536	0.80
Concentración de testosterona sérica, ng/dL	264.59 ^b	332.12 ^{ab}	403.87 ^a	33.681	0.09

^{a,b} Literales diferentes en el mismo renglón indican diferencias estadísticas significativas, ¹ Error Estándar de la Media.

El total de espermatozoides por eyaculado fue modificado ($P < 0.05$) por los tratamientos, observándose que los borregos que recibieron alimento adicionado con 70 ppm de zinc a partir de metionina de zinc, tuvieron una mayor producción espermática por eyaculado; lo que concuerda a lo observado en hombres (Wong *et al.*, 2002), borregos (Kendall *et al.*, 2000) y toros (Cupic *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2006); cuando recibieron dietas

adicionadas con zinc. Luque *et al.* (2009) al proporcionar dietas adicionadas con Zn a niveles máximos de 45 ppm no observó mejoras en esta variable. La respuesta obtenida con niveles de adicción de 70 ppm, se pudo deber a la mayor cantidad de Zn disponible en el organismo, dado que la producción de espermatozoides pasa por muchas divisiones celulares; por ende requiere grandes cantidades de zinc, ya que está involucrado en el metabolismo del ácido nucleico y de las proteínas; por lo tanto es esencial en la diferenciación y replicación celular (Underwood, 1981).

También se ha observado que en los túbulos seminíferos activa y mantiene el epitelio germinativo (Wong *et al.*, 2002); ayuda a codificar los factores de transcripción involucrados en la espermatogénesis (Bedwal y Bahuguna, 1994); además, las enzimas sorbitol deshidrogenasa y lactato deshidrogenasa son metaloenzimas dependientes del zinc, las cuales están involucradas en la espermatogénesis (Eggert *et al.* 2002). Todo ello puede explicar el incremento en el número de espermatozoides por eyaculado observados en el presente estudio en los borregos que consumieron dietas con niveles adicionales de 70 ppm de Zn orgánico.

El porcentaje de espermatozoide con morfología anormal se redujo ($P < 0.05$) en los borregos que recibieron la dieta adicionada con 70 ppm de zinc, a partir de metionina de Zn; estos resultados concuerdan con los reportados por Arthington *et al.* (2002), quien al proporcionar alimento adicionado con diferentes niveles y fuentes de zinc, por un periodo de 126 días a toros, encontraron una disminución en el porcentaje de anomalías. Sin embargo estos resultados no coinciden con los reportados por Kumar *et al.* (2006) y Luque *et al.* (2009), quienes no observaron una respuesta favorable al consumo adicional de zinc en la reducción de anomalías espermáticas en toros, cabras y borregos, respectivamente.

Las anomalías espermáticas se deben a fallas en la espermatogénesis (Barth y Oko, 1989; Barrio, 2002), relacionadas con los cambios cualitativos y cuantitativos del material nuclear y de los órganos de origen citoplasmático, así como por perturbaciones bioquímicas del plasma seminal; debido a procesos inflamatorios del testículo y de las glándulas sexuales accesorias; así como también al aumento o disminución de la temperatura en el testículo y por manipulaciones del semen durante su procesamiento (De Serrano *et al.*, 1989).

Como ya se mencionó, los espermatozoides pasan por diversas divisiones celulares (Underwood, 1981), por lo que asegurar niveles adecuados de Zn en el organismo animal puede disminuir las anomalías espermáticas. Underwood y Somers (1969) reportaron que la suplementación con zinc a borregos aumenta la producción diaria de espermatozoides y reduce la proporción de anomalías espermáticas, lo que coincide a lo observado en el presente trabajo.

En los borregos que recibieron alimento adicionado con 70 ppm de zinc, se observó una tendencia ($p = 0.09$) a incrementar los niveles plasmáticos de testosterona en comparación con los tratamientos ZnMet35 y el control (403.87 vs. 332.12 y 264.59 ng/dL). Estos resultados son similares a los reportados en toros (Kumar *et al.*, 2006; Xin *et al.*, 2007), en humanos (Hartoma *et al.*, 1977) y en conejos (El-Masry *et al.*, 1994). Sin embargo, son diferentes a los observados por Luque *et al.* (2009) al adicionar niveles máximos de 45 ppm de Zn orgánico. El aumento de los niveles plasmáticos de testosterona, se puede atribuir a la función del zinc en la esteroidogénesis testicular, ya que activa el sistema adenilciclasa, que estimula la síntesis de testosterona (El-Masry *et al.*, 1994); además es un componente de las proteínas involucradas en las síntesis y secreción de testosterona (Kumar *et al.*, 2006).

La concentración espermática, motilidad masal, motilidad individual y circunferencia escrotal no fueron modificadas ($P > 0.45$) por los tratamientos. Estos resultados son similares a los observados por Luque *et al.* (2009) y Arthington *et al.* (2002).

Los resultados obtenidos indican que la calidad seminal en borregos de pelo está relacionada con los niveles de Zn contenidos en la dieta, por lo que es necesario seguir investigando los niveles de adición óptimos, en los que se obtenga la mejor respuesta en la calidad seminal de los borregos, dado que la cantidad de estudios es limitada en esta especie animal y en especial en animales criados bajo condiciones de trópico seco.

CONCLUSIÓN

El consumo de dietas adicionadas con 70 ppm de zinc orgánico a partir de metionina de zinc eleva el volumen y la producción de espermatozoides por eyaculado, disminuye la proporción de espermatozoides con anormalidades morfológicas y eleva la concentración plasmática de testosterona en ovinos de pelo criados en condiciones subtropicales.

LITERATURA CITADA

ANDREINI C, Bertini I. A bioinformatics view of zinc enzymes. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2012; 111:150-6. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.11.020

AISEN EG. Reproducción ovina y caprina. Inter-médica. 2004: 206. ISBN 9505552785

ALMEIDA FFL, Marcelo CL, Luiz RF. Testis Morphometry, Duration of Spermatogenesis, and Spermatogenic Efficiency in the Wild Boar (*Sus scrofa scrofa*)¹. *Biology of Reproduction*. 2006; 75:792–799. DOI 10.1095/biolreprod.106.053835.

ARTHINGTON JD, Johnson KR, Corah LR, Willms CL, Hill DA. The effects of dietary Zinc concentration and source on yearling bull growth and fertility. *The Professional Animal Scientist*. 2002; 18: 282-285. doi:10.15232/S1080-7446(15)31534-5.

BARRIO AD. Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. XI Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. 2002.

www.avpa.ula.ve/congresos/cd_xi_congreso/pdf/diegotbarrios.PDF

BARTH AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University. Press/Ames. 1989: 285. ISBN 0813801125 9780813801124

BEDWAL RS, Bahuguna A. Zinc, copper and selenium in reproduction. *Experientia*. 1994; 50(7):625–640. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8033970

BRAY TM, Bettger WJ. The physiological role of zinc as an antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*. 1990; 8(3):281–291. www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2187766

CROXFORD TP, McCormick N H, Kelleher SL. Moderate Zinc Deficiency Reduces Testicular Zip6 and Zip10 Abundance and Impairs Spermatogenesis in Mice¹⁻³. *The Journal of Nutrition*. 2011; 141:359-365. doi:10.3945/jn.110.131318.

CUPIC Z, Sinovec Z, Veselinovic S, Ivkov O, Veselinovic S, Medic D, Ivancev N, Grubac S. The effect of dietary zinc, on semen quality in holstein-friesian bulls. 4th International Symposium on Animal Reproduction, Ohrid, Macedonia. 1998:96-98

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.549.5946&rep=rep1&type=pdf>

DE SERRANO GL, Fuentes A, Valle A, Regueiro C. Estudio de las anomalías espermáticas de los verracos en relación con raza y época. *Zootecnia Tropical*. 1989; 7(1-2):93-117.

http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/ZootecniaTropical/zt0712/texto/estudio.htm

EGGERT KW, Zwick EM, Batschulat K, Rohr G, Armbruster FP, Petzoldt D, Strowitzki T. Are zinc level in seminal plasma associated with seminal leukocyte and other determinant of semen quality. *Fertility and Sterility*. 2002; 7(2):260–269.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)02974-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(01)02974-0)

EL-MASRY K, Kamal TH. Influences of season and dietary supplementation with selenium and vitamin E or zinc on some blood constituents and semen quality of New Zealand White rabbit males. *World Rabbit Science*. 1994; 2(3):79–86.

<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/.../221-371-1-SM.pd...>

ELZANATY S, Malm J, Giwercman A. Viscoelasticity of seminal fluid in relation to the epidymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. *International Journal of Andrology*. 2004; 27(2):94-100.

doi:10.1046/j.1365-2605.2003.00455.x

EVANS G, Maxwell WMC. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney. 1990:185. ISBN0409491772

GARCÍA-CONTRERAS A, De Loera J, García-Artiga C, Palomo A, Guevara JA, Herrera-Haro J, López-Fernández C, Johnston S, Gonsálvez J. Elevated dietary intake of Zn-methionate is associated with increased sperm DNA fragmentation in the boar. *Reproductive Toxicology*. 2011; 31(4):570–573. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.12.003

HAMBIDGE KM, Casey CE, Krebs NF. Zinc. In: Mertz, W.D. Ed. Trace Elements in Human and Animal Nutrition 2. Academic Press, Orlando, FL. 1986:1-109.

ISBN 0-12-491252-4

HARTOMA TR, Nahoul K, Netter A. Zinc, plasma androgen and male sterility. *Lancet*. 1977; 2 (8048): 1125–1126. www.ponline.org/node/434785

HESKETH JE. Zinc-stimulated microtubule assembly and evidence for zinc binding to tubulin. *International Journal of Biochemistry*. 1982; 14(11):983-990.

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7141075

KENDALL NR, McMullen S, Green A, Rodway RG. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace elements status and semen quality of ram lambs. *Animal Reproduction Science*. 2000; 62(4):277-283.

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924830

KUMAR N, Verma RP, Singh LP, Varshney VP, Dass RS. Effect of different levels and sources of zinc supplementation on quantitative semen attributes and serum testosterone level in crossbred cattle (*Bos indicus* X *Bos Taurus*) bulls. *Reproduction Nutrition Development*. 2006; 46: 663-675. doi:10.1051/rnd:2006041

LUQUE AM, Mendoza MI, García GD, Almeida VL, Valdez LM, Rodríguez MJ. Efecto de la adición de zinc en la dieta sobre las características cualitativas y cuantitativas del semen de ovinos. XIV Congreso latinoamericano de BUIATRÍA, Lima, Perú. 2009.

www.engormix.com/MA.../xiv-congreso-latinoamericanobuiatria-2009-t788-info.htm

MARTIN GB, White CL, Markey CM, Blackberry MA. Effect of dietary zinc deficiency on the reproductive system of young male sheep: testicular growth and secretion of inhibin and testosterone. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1994; 101:87-96.

doi:10.1530/jrf.0.1010087

MELLISHON E, Gallegos A. Manual de laboratorio de reproducción animal. 2006. <http://tarwi.lamolina.edu.pe/emellisho/reproduccion/Pract05.pdf>

MÉNDEZ JV, Quiroga TM, Martínez E, Ledezma AJ, Villalobos BJ. Pubertad en corderos Pelibuey nacidos de ovejas con reproducción estacional o continua. Revista Científica FCV-LUZ. 2005; XV(5):437-442. www.redalyc.org/articulo.oa?id=95915507

NAGAMINE CM, Chan K, Hake L, Lau YFC. The two-candidate testis-determining Y genes (Zfy-1 and Zfy-2) are differentially expressed in fetal and adult mouse tissues. *Genes & Development*. 1990; 4:63-74. genesdev.cshlp.org/content/4/1/63.full.pdf

NRC. National Research Council. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. 2007:112-149. ISBN: 978-0-309-10213-1

ROLF C, Cooper TG, Yeung CH, Nieschlag E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E. *Human Reproduction*. 1999; 14(4):1028–1033.
doi: 10.1093/humrep/14.4.1028

STEEL GD, Torrie JH. Bioestadística: Principios y Procedimientos (2da. Ed.). McGraw-Hill, México, D. F. 1985:132-162. ISBN:0-07-060926-8

UNDERWOOD EJ. Mineral nutrition of livestock. UK by the MPG Books Group. 2010; 426-458. ISBN-13: 978 1 84593 472 9

UNDERWOOD EJ, 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*. 1969; 20(5):889–897. <http://dx.doi.org/10.1071/AR9690889>

WONG WY, Merkus HM, Thomas CM, Menkveld R, Zielhuis GA, Steegers-Theunissen RP. Effect of folic acid and zinc sulphate on male factor sub fertility, a double blind, randomized placed controlled trial. *Fertility and Sterility*. 2002; 77(3): 491–498.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(01\)03229-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(01)03229-0)

XIN F, Hou M, Li W, Li Y, Wang L, Song J, Zhang J. Effect of Different Levels of Zinc on Blood Physiological and Biochemical Parameters in Stud Holstein Bulls. *Chinese Journal of Animal Nutrition*. 2007; 19(5):1-5.

<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:w7IXBu5ZN9MJ:www.chinajan.com/CN/article/downloadArticleFile.do%3FattachType%3DPDF%26id%3D8827+%&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=mx>

ZAGO MP, Oteiza PI. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001; 31(2):266–274.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00583-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00583-4)