

Patrícia Barbosa Salla Cardoso

**Método de extração para determinação do perfil lipídico do
sêmen ovino através do HPLC**

São Paulo

2009

Patrícia Barbosa Salla Cardoso

**Método de extração para determinação do perfil lipídico do
sêmen ovino através do HPLC**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Profa. Dra. Valquíria Hyppolito Barnabe

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2218
FMVZ

Salla Cardoso, Patrícia Barbosa

Método de extração para determinação do perfil lipídico do sêmen ovino através do HPLC / Patrícia Barbosa Salla Cardoso. -- 2009.

79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2009.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Valquíria Hyppolito Barnabe.

1. Sêmen. 2. Ovino. 3. Perfil lipídico. 4. HPLC. 5. Extração. I. Título.

ERRATA

SALLA CARDOSO, P. B. **Método de extração para determinação do perfil lipídico do sêmen ovino através do HPLC.** [Extraction method for determination of lipid profile in ram sperm by HPLC]. 2009. 79f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Página	Parágrafo	Linha	Onde se lê	Leia - se
10	1	3	Tese	Dissertação
11	1	3	Tese	Dissertação
53	1	2	63,15 ± 9,92	339,62 ± 53,37
53	1	2	5,07 ± 1,41	27,09 ± 7,61
53	2	2	Tabela 1	Tabela 5



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

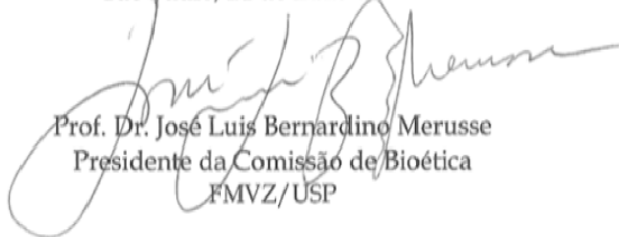
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Método de extração para determinação do perfil lipídico do sêmen ovino através do HPLC", protocolado sob o nº1097/2007, utilizando 7 (sete) ovinos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Valquíria Hyppolito Barnabe, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 23/05/07.

(We certify that the Research "Extraction method for lipid profile determination in sheep semen using HPLC", protocol number 1097/2007, utilizing 7 (seven) sheeps, under the responsibility Profa. Dra. Valquíria Hyppolito Barnabe, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 05/23/2007).

São Paulo, 24 de maio de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Salla Cardoso, Patrícia Barbosa

Título: Método de extração para determinação do perfil lipídico do sêmen ovino através do HPLC

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico,

A meus pais, Lourdes e Élio, pelo apoio de sempre. Por terem sido responsáveis por quem eu sou. Pela amizade e pelo amor. Pelo carinho e pelas broncas e por sempre acreditarem no meu sucesso.

A minha irmã Soraia pela sua amizade, incentivo e companheirismo, mesmo que por muitas vezes à distância.

Ao meu marido Cezar, por seu amor, por seu carinho e incentivo. Por acreditar que sou sempre capaz. Por ser sempre tão paciente comigo nos meus momentos mais conturbados. Por estar sempre ao meu lado.

Aos meus avós pelas lições de vida.

Aos pais do Cezar, D. Ana e Seu Aureli, por me receberem em sua casa como filha. Pelo apoio e carinho.

A Lourdes e D. Clery pelo carinho.

À Deus, por me iluminar em todos os momentos de minha vida. Por tudo que tenho e que sou. Pela bênção recebida a cada dia.

Ao Toby e a Sade por serem lindos e sempre me receberem com todo o amor que tem para dar. Pela inocência e pela vontade de viver.

E por último, porém não menos importante, à minha filha Camile que com apenas 3 meses já me traz tanta felicidade. Por fazer hoje parte da minha vida, ou melhor, por ser a minha vida!

Agradecimentos

Aqui tenho que fazer um agradecimento geral a todas as pessoas que participaram da minha vida nesses dois anos que se passaram, mesmo que por alguns instantes. Pelas horas boas e pelas horas ruins.

À Profa. Valquíria H. Barnabe por ter me aceitado como orientada sem nem me conhecer, apenas acreditando na indicação da Profa. Dra. Camila Vannuchi e pela orientação e confiança.

Ao Prof. Renato C. Barnabe pelo apoio e pela orientação.

Ao Marcílio Nichi por toda a paciência no laboratório e reuniões científicas. Pelos ensinamentos, conversas e amizade. Pelas estatísticas. Também pelo Yakissoba. É uma grande pessoa, prestativa e amiga.

À Paola Góes por sempre ter me aberto os olhos e pelo seu realismo. Também pela ajuda e amizade.

À Maria Amélia por sempre estar ao meu lado, principalmente nos momentos em que eu me sentia mais sozinha. Obrigada pelo apoio!

À Profa. Dra. Silvia Crusco pela amizade, companheirismo, trabalhos, conversas e muitas coxinhas.

À Profa. Dra. Camila Vannuchi pelo estágio, indicação e confiança.

Ao Laboratorio de Andrologia, Eduardo, Mariana Rodrigues, Pedro Ivo e Andressa pelas horas irreverentes, conversas e pela ajuda.

Aos professores Mayra, Visintin, Marcelo, Clair, Kiky, Pietro e Rubens pelas aulas, ajudas e ensinamentos.

Ao laboratório do ICB sob responsabilidade do Prof. Dr. Rui Curi e seus alunos Hilton, Jarlei e Haroldo pela ajuda e colaboração oferecida nesse projeto.

À Thaís pela nova amizade e pelos longos papos.

À Harumi e Alice pela companhia nos almoços e por toda ajuda.

À Dona Silvia pelos deliciosos cafezinhos.

Ao Miguel, Ira, Belau e Luís pelos animais e ajuda nas coletas.

Aos meus novos colegas de profissão:

- Cinthia, Dominique, Tatiana, Priscila, Lilian, Marina, Marie, Manu;

- Liege, Cris Lúcio, Jaqueline, Gisele, Fernanda;

- Paulo, Renata, Adriano, Flávia, Mariana, Zeca, Camila, Maza, Fabíola;

- Gabriel, Zé, Lindsay, Roberta, Everton.

Aos amigos de toda a minha vida: Mariana Passini, Margery Adesina, Déborah Brandão, Paula Vasconcelos, Newton, Fernanda Marques, Miguel, Juliana, Adelino, Evelyn, Leandro Peluchi, Lucimara, Leandro Kiss, Rose, Ana Paula, Miroca, André e Adriano.

A Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo por ter me acolhido e me recebido bem.

A Casa das Teses por me atenderem tão em cima da hora e tudo ficar lindo.

A Elza Faquim e a todos da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice pela gentileza e rapidez.

A Capes pela bolsa cedida, possibilitando a realização deste mestrado.

Epígrafe

*Somewhere over the rainbow
Way up high
And the dreams that you dreamed of
Once in a lullaby ii ii iii
Somewhere over the rainbow
Blue birds fly
And the dreams that you dreamed of
Dreams really do come true ooh ooooh
Someday I'll wish upon a star
Wake up where the clouds are far behind me ee ee eeh
Where trouble melts like lemon drops
High above the chimney tops that's where you'll find me oh
Somewhere over the rainbow blue birds fly
And the dream that you dare to, why, oh why can't I? i iii*

*Well I see trees of green and
Red roses too,
I'll watch them bloom for me and you
And I think to myself
What a wonderful world*

*Well I see skies of blue and I see clouds of white
And the brightness of day
I like the dark and I think to myself
What a wonderful world*

*The colors of the rainbow so pretty in the sky
Are also on the faces of people passing by
I see friends shaking hands
Saying, "How do you do?"
They're really saying, "I...I love you
I hear babies cry and I watch them grow,
They'll learn much more
Than we'll know
And I think to myself
What a wonderful world (u)ooooorld*

Someday I'll wish upon a star.

*Wake up where the clouds are far behind me
Where trouble melts like lemon drops
High above the chimney top that's where you'll find me
Oh, Somewhere over the rainbow way up high
And the dream that you dare to, why, oh why can't I? I hiii?*

(Interpretação: Israel Kamakawiwo'ole)

RESUMO

SALLA CARDOSO, P. B. **Método de extração para determinação do perfil lipídico do sêmen ovino através do HPLC.** [Extraction method for determination of lipid profile in ram sperm by HPLC]. 2009. 79f. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Os ovinos domésticos (*Ovis aries*) estão entre os primeiros animais domesticados para lã, leite, carne e pele. Novas biotecnologias de avaliação e manipulação do sêmen estão sendo estudadas para a elucidação de causas de infertilidade em machos. Sabe-se que danos causados na membrana espermática diminuem a qualidade seminal. Considerando que as membranas são compostas por uma bicamada de fosfolipídios e que a peroxidação lipídica é uma das principais causadoras de lesão celular, explica-se a importância de estudos sobre os lipídios constituintes do sêmen. A peroxidação lipídica é consequente da reação entre os lipídios e as espécies reativas de oxigênio que são fisiologicamente produzidas pelo metabolismo celular. Esse quadro pode ser diminuído pela presença de antioxidantes no sêmen, como a vitamina E. O sêmen foi coletado através da técnica da vagina artificial e após análise imediata e mediata, foi centrifugado para a obtenção de duas frações: plasma seminal e pellet de espermatozóide. Ambas tiveram seus lipídios extraídos por dois métodos diferentes e foram qualificados e quantificados pela especificidade e sensibilidade da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e assim pudemos escolher qual o melhor processo de extração. A análise estatística dos dados foi realizada através do programa SAS for Windows. O AG saturado predominante no espermatozóide é o mirístico e o AG insaturado predominante é o DHA, em ambas as extrações. No plasma seminal, nos dois métodos, o AG saturado que prevalece é o palmítico e o insaturado é o oléico. Dentre os métodos Folch (1957) modificados estudados, o que obtivemos melhores resultados na identificação e quantificação dos AG foi a extração 1.

Palavras-chave: Sêmen. Ovino. Perfil lipídico. HPLC. Extração.

Abstract

SALLA CARDOSO, P. B. Extraction method for determination of lipid profile in ram sperm by HPLC. [**Método de extração para determinação do perfil lipídico do sêmen ovino através do HPLC**]. 2009. 79f. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The domestic sheep (*Ovis Aries*) is one of the first domesticated animals for wool, milk and meat production. The study of technologies for assessment and handling of semen are in course for the elucidation of male infertility causes. It is well known that damage to the sperm membrane decreases semen quality. Considering that the membranes are composed by a phospholipid bilayer, lipid peroxidation is a major cause of cell damage and explains the importance of studies on lipid components of semen. Lipid peroxidation is a consequence of the reaction between lipids and reactive oxygen species that are physiologically produced by cellular metabolism. This event may be reduced in the presence of antioxidants in semen, such as tocopherol. Semen was collected by artificial vagina and, after sperm evaluation, samples were centrifuged resulting in two fractions: seminal plasma and spermatozoa pellet. Both had their lipids extracted by two different methods and were qualified and quantified for the sensitivity and specificity to the high performance liquid chromatography in order to determine the most efficient extraction technique. Statistical analysis was performed using SAS software for Windows. The predominant saturated fatty acid in sperm is the myristic and the most abundant insaturated fatty acid in both extractions was DHA. In seminal plasma, in both methods, the prevailing fatty acid is the saturated palmitic and the unsaturated oleic. Among the methods evaluated, we obtained the best results of identification and quantification of fatty acids in extraction 1.

Key-words: Semen. Sheep. Lipid profile. HPLC. Extraction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a concentração (ng/g) do total de ácidos graxos saturados e insaturados dos espermatozóides avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo - 2008 a 2009 46
- Figura 2 - Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a porcentagem do total de ácidos graxos saturados e insaturados dos espermatozóides avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo - 2008 a 2009 48
- Figura 3 - Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a concentração (ng/ml) do total de ácidos graxos saturados e insaturados do plasma seminal avaliado através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo - 2008 a 2009..... 50
- Figura 4 - Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a porcentagem dos ácidos graxos do plasma seminal avaliado através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo - 2008 a 2009 52
- Figura 5 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a concentração (ng/g e ng/ml, respectivamente) do total de ácidos graxos saturados e insaturados avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 1 - São Paulo - 2008 a 2009..... 55
- Figura 6 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a porcentagem do total de ácidos graxos saturados e insaturados avaliados pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 1 - São Paulo - 2008 a 2009..... 57

- Figura 7 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a concentração (ng/g e ng/ml, respectivamente) do total dos ácidos graxos saturados e insaturados avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 2 - São Paulo – 2008 a 2009..... 59
- Figura 8 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a porcentagem do total de ácidos graxos saturados e insaturados avaliados pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 2 - São Paulo – 2008 a 2009..... 61

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a concentração (ng/g) dos ácidos graxos dos espermatozóides avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo – 2008 a 2009..... 45
- Tabela 2 - Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a porcentagem dos ácidos graxos dos espermatozóides avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo – 2008 a 2009..... 47
- Tabela 3 - Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a concentração (ng/ml) dos ácidos graxos do plasma seminal avaliado através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo – 2008 a 2009..... 49
- Tabela 4 - Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a porcentagem dos ácidos graxos do plasma seminal avaliado através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo – 2008 a 2009..... 51
- Tabela 5 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a concentração (ng/g e ng/ml, respectivamente) dos ácidos graxos avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 1 - São Paulo – 2008 a 2009..... 54
- Tabela 6 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a porcentagem dos ácidos graxos avaliados pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 1 - São Paulo – 2008 a 2009 56
- Tabela 7 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a concentração (ng/g e ng/ml, respectivamente) dos ácidos graxos avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 2 - São Paulo – 2008 a 2009..... 58

Tabela 8 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a porcentagem dos ácidos graxos avaliados pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 2 - São Paulo – 2008 a 2009..... 60

Lista de Símbolos

PGF	Prostaglandina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
AG	Ácido graxo
DHA	Ácido docosahexaenóico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performancy Liquid Chromatography)
%	Porcento
IgA	Imunoglobulina A
α	Alfa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
OH^-	Radical hidroxila
O_2^-	Ânion superóxido
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
NO_2	Óxido nítrico
UV	Ultra-violeta
$^\circ$	Grau
C	Celsius
μl	Microlitros
ACN	Acetonitrila
ml	Mililitros
Nm	Nanômetro
Kg/cm^2	Kilograma por centímetro quadrado

NaOH	Hidróxido de sódio
M	Molar
PM	Peso Molecular
g	Grama
q.s.p.	Quantidade suficiente para
KOH	Hidróxido de potássio
mg	Miligrama
ng	Nanograma
±	Mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE OVINA.....	24
2.2	CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DA ESPÉCIE.....	25
2.3	SÊMEN: PLASMA SEMINAL E ESPERMATOZÓIDE.....	26
2.4	LIPÍDIOS.....	27
2.5	MEMBRANA ESPERMÁTICA.....	29
2.6	ESTRESSE OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	30
2.7	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (High Performancy Liquid Chromatography – HPLC).....	32
3	OBJETIVO	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1	LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL.....	34
4.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS E MANEJO.....	36
4.3	COLETA DE SÊMEN.....	37
4.4	PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS.....	37
4.5	PERFIL DO ÁCIDO GRAXO ESPERMÁTICO E DO PLASMA SEMINAL.....	38
4.5.1	Extração de lipídios – método 1	38
4.5.2	Extração de lipídios – método 2	39
4.5.3	Saponificação	39
4.5.4	Dervatização e Cromatografia	40
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	EFEITO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÕES SOBRE OS ÁCIDOS GRAXOS NO ESPERMATOZÓIDE	44
5.2	EFEITO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÕES SOBRE OS ÁCIDOS GRAXOS NO PLASMA SEMINAL.....	48
5.3	ÁCIDOS GRAXOS NO ESPERMATOZÓIDE E NO PLASMA SEMINAL – EXTRAÇÃO 1.....	53
5.4	ÁCIDOS GRAXOS NO ESPERMATOZÓIDE E NO PLASMA SEMINAL – EXTRAÇÃO 2.....	57
6	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXOS	75

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Os ovinos foram domesticados na Ásia Central e por 10000 anos eles têm servido aos humanos, convertendo forrageiras em produtos humanos de alta qualidade (OLIVEIRA, 2008), como leite, carne, pele e lã (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Segundo dados obtidos por Lima (2008), o rebanho de ovinos no Brasil aumentou 37,8% entre 2003 e 2005, informação que confirma a importância da criação desses animais e a necessidade de mais pesquisas sobre sua produção e reprodução.

São animais considerados sazonais, o que influencia diretamente na qualidade e volume espermático (MOBINI; HEATH; POUGH, 2004), como mostrou Dufor, Fahmy e Minvielle (1984) ao provar que a produção de plasma seminal varia de acordo com a estação do ano. Sabendo-se que há certa variação no tamanho testicular pela sazonalidade, carneiros apresentam grandes reservas epididimárias (DERIVAUX, 1980).

De acordo com Mies Filho e Barreto (1949) o sêmen é dividido em duas partes: o figurado que se refere ao espermatozóide; e o não figurado, que se refere ao plasma seminal. Este possui três funções principais: atua como veículo para os espermatozoides; participa da sua ativação e proporciona um meio rico em nutrientes que mantêm as células espermáticas vivas no trato genital feminino (SALAMON, 1990).

Salamon (1990) ainda relata que o sêmen ovino é constituído principalmente por ácido cítrico, frutose, glicerilfosforilcolina, sorbitol, inositol, fosfolipídios, proteínas e prostaglandina (PGF), além de espécies reativas de oxigênio (ROS) e antioxidantes, de acordo com Shamsi et al. (2009).

O espermatozóide possui uma cápsula lipóide ao seu redor que exerce função protetora e de resistência (MIES FILHO; BARRETO, 1949). São formados de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios; fósforo, nitrogênio e enxofre; colesterol (GRIZARD et al., 2000) e os fosfolipídios, presentes em grande quantidade na membrana espermática e mitocondrial, que varia entre as espécies (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Os lipídios são substâncias orgânicas oleosas ou gordurosas, insolúveis em água (LEHNINGER, 1986) que tem como unidade funcional o ácido graxo (AG), este

dividido em saturado, com nenhuma ligação dupla na cadeia e em insaturado, com um ou mais duplas ligações (WISCHRAL, 1998). A insaturação torna o ácido graxo menos ligado às membranas biológicas (CLARENBURG, 1992).

Os AG não saturados (ácido linoléico, linólico, araquidônico) apresentam grande atividade biológica e tem influência sobre as funções genitais. A sua ausência pode acarretar esterilidade ou diminuição do apetite sexual (DERIVAUX, 1980). Há grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) na membrana espermática, como o ácido docosahexaenóico (DHA) (OLLERO; POWERS; ALVAREZ, 2000), que permite a fluidez necessária para os eventos associados à fertilização (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985) e torna os espermatozoides vulneráveis ao estresse oxidativo causado pelas ROS (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985; LI; SHANG; CHEN, 2004; HATAMOTO et al., 2006).

A membrana espermática, assim como as outras membranas biológicas possuem uma bicamada de fosfolípido com proteínas associadas e atua como barreira seletiva (COOPER, 1996). No espermatozoide a membrana tem importante função na fertilização, participando da reação acrossômica e da fusão do oócito (KHOSROWBEYGI; ZARGHAMI, 2007). A composição lipídica da membrana espermática só é estabelecida após sua maturação epididimária. (HOLT, 1995; LENZI et al., 1996; GRIZARD et al., 2000).

O espermatozoide é particularmente vulnerável à peroxidação lipídica, pois sua membrana plasmática é rica em PUFAs. O dano causado na membrana leva a alterações de morfologia e motilidade. Esses efeitos deletérios causados pelas ROS ocorrem quando há um desequilíbrio entre elas e os antioxidantes durante a maturação espermática no epidídimo ou quando há um distúrbio no plasma seminal. Porém a existência fisiológica de ROS no sêmen é vital para a proliferação e diferenciação espermática de acordo com Shamsi et al. (2009).

Este estudo visou a extração dos lipídios do plasma seminal e da membrana espermática, por dois métodos diferentes, baseados no método de Folch, Lees e Stanley (1957), modificado, utilizando clorofórmio e metanol como solventes. A amostra obtida dessa extração foi qualificada e quantificada pela Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC), e assim escolhido o melhor processo de extração.

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão abordará a importância de estudos para a reprodução animal objetivando a solução de problemas de fertilidade.

2.1 IMPORTÂNCIA DA ESPÉCIE OVINA

Os ovinos domésticos (*Ovis aries*), pertencentes à família Bovidae, estão entre os primeiros animais domesticados para a comercialização de lã, leite, carne e pele (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Provavelmente foram domesticadas na Ásia Central e aparentemente, por 10.000 anos, esta espécie tem servido as pessoas, convertendo forrageiras em produtos de consumo humano de alta qualidade (OLIVEIRA, 2008). Segundo Granados, Dias e Sales (2006), a criação de ovinos está em crescimento mundial e se intensificou, sobretudo em países em desenvolvimento, por desempenhar importante função socioeconômica.

Segundo dados obtidos por Lima (2008), o rebanho de ovinos no Brasil aumentou 37,8% entre 2003 e 2005, informação que confirma a importância da criação desses animais e a necessidade de mais pesquisas sobre sua produção e reprodução. Por este motivo, o interesse na reprodução de ovinos, com o objetivo de melhoramento e difusão de diferentes raças, desponta como um vasto campo para pesquisadores da atualidade, que estão estudando novas biotecnologias de avaliação e manipulação do sêmen, assim como os seus componentes, por exemplo, o lipídio, para a elucidação de causas de infertilidade em machos.

2.2 CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DA ESPÉCIE

Entram na puberdade entre 6 e 7 meses de idade e sofrem influência de fatores físicos, fotoperiodismo, raça, temperatura ambiente, peso corpóreo e nutrição (HAFEZ; HAFEZ, 2004), produzindo ainda espermatozóides com defeitos e em concentrações inadequadas. Somente quando alcançam 70% do peso adulto devem ser introduzidos na reprodução, quando suas células espermáticas se encontrarem viáveis para a fecundação (GRANADOS; DIAS; SALES, 2006).

Considerados reprodutores sazonais, característica que se manifesta na qualidade do esperma, volume diário, atividade sexual e até tamanho da circunferência escrotal. A sazonalidade é conseqüente da alta produção de melatonina pela glândula pineal em períodos escuros (MOBINI; HEATH; POUGH, 2004). Mesmo que dias curtos reduzam a secreção de gonadotrofina na época não reprodutora, sempre há liberação suficiente do hormônio para manter um nível relativamente baixo de produção de espermatozóide e andrógeno, ou seja, o animal não se torna estéril nesse período, mas apresenta uma diminuição de tamanho testicular (EVANS; MAXWELL, 1990).

No Brasil, em ovinos oriundos da África e países do hemisfério Sul (Santa Inês, Dooper), não está claro a influência da estacionalidade, mas percebe-se uma maior concentração de partos em determinado período do ano. Já os oriundos do hemisfério Norte (Laucune, Bergamacia), ainda preservam características de estacionalidade reprodutiva. (GRANADOS; DIAS; SALES, 2006).

Dufor, Fahmy e Minvielle (1984), mostraram que a produção do plasma seminal variou significativamente com a estação do ano, assim como a motilidade dos espermatozóides que diminuiu durante a primavera. Hafez e Hafez (2004) relatam que esses animais não apresentam uma estação de monta restrita, embora a atividade sexual seja maior no outono, declinando no fim do inverno, primavera e verão.

A influência da época do ano é revelada durante as estações secas, ocorrendo redução significativa no tamanho dos testículos. Maior perímetro escrotal é encontrado no período chuvoso. Em regiões temperadas, a sazonalidade dos carneiros no tocante a qualidade do sêmen é atribuída à combinação entre fotoperíodo e temperatura,

enquanto que em regiões tropicais o efeito ambiental parece estar mais relacionado com a chuva e seu efeito na quantidade e qualidade da forragem (MARTINS et al., 2003).

Sabendo-se que há certa variação no tamanho testicular pela sazonalidade, carneiros apresentam grandes reservas epididimárias (DERIVAUX, 1980). A frequência de coletas de sêmen depende da idade, da condição e do temperamento do animal, podendo ejacular de 10 a 15 vezes de acordo com Evans e Maxwell (1990); ou até 30 vezes para Derivaux (1980), que assegura que com uma a duas coletas diárias é o suficiente para manter as reservas em taxas convenientes para uma boa produção.

Com a frequência de coletas, o volume e a concentração do sêmen diminui, recomendando-se um intervalo de 2 a 3 dias entre os dias de coleta e intervalos de 30 a 60 minutos entre uma coleta e outra (DURAN DEL CAMPO, 1980; EVANS; MAXWELL, 1990). Gordon (1999), refere que sucessivas ejaculações afetam a quantidade, mas não a qualidade dos gametas masculinos.

2.3 SÊMEN: PLASMA SEMINAL E ESPERMATOZÓIDE

Mies Filho e Barreto (1949), considera que o sêmen é constituído por duas classes distintas de elementos, o figurado, espermatozóides e granulações; e o não figurado, constituído principalmente de 85% a 90% de água, e o restante pelas substâncias orgânicas: proteínas, gorduras, açúcares e pelos sais, constituindo o plasma seminal, que de acordo com Salamon (1990), apresenta três funções principais: atua como veículo para os espermatozóides; participa da ativação dos espermatozóides e proporciona um meio rico em nutrientes que mantêm os espermatozóides vivos no trato genital feminino.

O plasma seminal ovino é constituído principalmente por: ácido cítrico, frutose, glicerilfosforilcolina, sorbitol, inositol, fosfolipídios, proteínas e PGF (se origina da glândula vesicular e é derivada do ácido araquidônico) (SALAMON, 1990). Pode-se considerar ainda a presença de vesiglandina, adrenalina e noradrenalina (DERIVAUX,

1980; GORDON, 1999), constituintes antimicrobianos, as imunoglobulinas do tipo IgA (HAFEZ; HAFEZ, 2004), além de ROS e antioxidantes, como o ácido ascórbico (SONG; NORKUS; LEWIS, 2006; SHAMSI et al., 2009).

A alta concentração de PGF no sêmen de carneiros estimula poderosas contrações na musculatura uterina, colaborando com o transporte dos espermatozóides no trato genital feminino. (SALAMON, 1990). Além disso, sabe-se que ovinos tratados com PGF sintéticas apresentaram um aumento significativo no volume do ejaculado e no espermatozóide total por ejaculado (GORDON, 1999).

Os espermatozóides são produzidos nos testículos e armazenados na luz do epidídimo, onde há a formação de uma cápsula lipóide ao redor das células espermáticas, que exerce ação protetora e de resistência (MIES FILHO; BARRETO, 1949). São formados de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios; fósforo, nitrogênio e enxofre; colesterol (GRIZARD et al., 2000) e os fosfolipídios, presentes em grande quantidade na membrana espermática e mitocondrial, que varia entre as espécies (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Segundo Hinkovska – Galcheva, Petkova e Koumanov (1989), a membrana espermática em ovinos tem uma particular composição lipídica, apresentando uma distribuição assimétrica desse constituinte determinante na motilidade, viabilidade, peroxidação lipídica e choque térmico no espermatozóide (BUKAR et al., 2007). Cerolini et al. (2001), relata ainda que a composição lipídica da membrana é um importante fator na congelabilidade do gameta masculino.

2.4 LIPÍDIOS

Substâncias orgânicas oleosas ou gordurosas, insolúveis em água (LEHNINGER, 1986), extraídas das células e tecidos por solventes não polares, como clorofórmio, metanol ou éter (BLIGH; DYER, 1959).

São classificados nas seguintes classes: trigliceróis; ceras; fosfolipídios e esfingolipídios, ambos componentes de membrana; esteróides, solúveis em gorduras,

sendo o mais abundante o colesterol (LDL, VLDL e HDL); e as lipoproteínas (LEHNINGER, 1986).

A unidade fundamental dos lipídios é o AG, sendo classificado em dois grandes grupos: saturados e insaturados. Os saturados são os que não possuem duplas ligações na cadeia e insaturados apresentam uma ou mais duplas ligações (WISCHRAL, 1998), podendo estar ligados a diferentes classes lipídicas (LEHNINGER, 1986; PARKS; LYNCH, 1992). A insaturação de um AG promove dobramentos da cadeia, o que o torna menos ligado às membranas biológicas e com ponto de fusão mais baixo, comparado aos ácidos saturados que são mais lineares e mais fortemente ligadas às membranas (CLARENBURG, 1992).

Os AG não saturados (ácido linoléico, linólico, araquidônico) apresentam grande atividade biológica e tem influência sobre as funções genitais. A sua ausência pode acarretar esterilidade ou diminuição do apetite sexual (DERIVAUX, 1980). Os linoléico e linólico são encontrados em óleos de sementes de plantas, em folhas verdes e no leite (CLARENBURG, 1992) e o araquidônico é o principal precursor das PGF (WISCHRAL, 1998).

Na maioria das espécies, o ácido oléico predomina entre os triglicerídeos do tecido adiposo. No entanto, em ruminantes, há predominância do ácido esteárico (saturado), tornando a gordura mais sólida (CLARENBURG, 1992).

Há grande quantidade de PUFA's na membrana espermática, como o DHA (OLLERO; POWERS; ALVARY, 2000), que permite a fluidez necessária para os eventos associados à fertilização (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985) e torna os espermatozoides vulneráveis ao estresse oxidativo causado pelas ROS (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985; LI, SHANG; CHEN, 2004; HATAMOTO et al., 2006).

Em humanos, a redução do DHA está diretamente correlacionada com redução de concentração e motilidade espermática (ROOKE; SHAO; SPEAKE, 2001), reduzindo a capacidade fertilizante do espermatozoide (OLIVEIRA et al., 2006). Aksoy et al. (2006) cita em seu estudo que a composição de DHA no sêmen total de homens inférteis é menor quando comparado com homens férteis, em contrapartida Khosrowbeygi e Zarghami (2007) apresentaram como resultado de sua pesquisa que o grupo controle tem menor concentração de AG que o grupo de pacientes com alguma

alteração espermática, considerando os seguintes AGs: ácido palmítico, esteárico, oléico, linoléico, araquidônico e DHA.

De acordo com Blesbois et al. (1997), aves têm composição de AGs semelhantes no espermatozóide e no plasma seminal após extração em cromatografia gasosa, sendo os AGs predominantes o ácido esteárico (AG saturado) e os ácidos araquidônico e docosatetraenóico (PUFAs).

2.5 MEMBRANA ESPERMÁTICA

O estudo da complexa estrutura e funcionamento da membrana espermática é um dos passos mais importantes para o entendimento das interações das células espermáticas com o meio que as circunda, pela alta presença de PUFAs, fazendo com que o espermatozóide seja susceptível aos danos causados pela peroxidação lipídica e choque térmico, causando um enfraquecimento da função espermática através do estresse oxidativo (LENZI et al., 1996).

O modelo básico das membranas biológicas segue a organização estrutural de bicamada de fosfolipídios com proteínas associadas e atua como barreira seletiva, determinando a composição do citoplasma celular (COOPER, 1996), verificado também nas membranas espermáticas (WATSON, 1981; WATSON, 1995), com um papel ativo em sua capacidade fertilizante (O'RAND, 1982; HOLT, 1995), ou seja, reação acrossômica e fusão do oócito (KHOSROWBEYGI; ZARGHAMI, 2007). A composição lipídica da membrana espermática só é estabelecida após sua maturação epididimária. (LENZI et al., 1996; GRIZARD et al., 2000).

Castellini et al. (2006) ao estudar coelhos determinou que no espermatozóide a concentração de fosfolipídio é bem maior que no PS, que não chega a 50% dos fosfolipídios totais, em concordância com Watson (1981) que relata que os fosfolipídios são constituintes de grande parte das membranas espermáticas, sendo responsáveis por cerca de 60 a 70% dos lipídios totais de um ejaculado.

Há também grande quantidade de colesterol, que varia entre as diferentes partes da célula, entre as espécies animais e ainda entre indivíduos de uma mesma espécie (HOLT, 1995). Cross (1998), relatou que a taxa colesterol/fosfolipídio existente na membrana espermática exerce importante papel regulador do processo de capacitação espermática, além de estar diretamente relacionada com a fluidez de membrana (RANA; MAJUMDER, 1995).

2.6 ESTRESSE OXIDATIVO E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

O estresse oxidativo causado pelas ROS tem sido recentemente considerado a maior causa de infertilidade em homens como refere Colagar e Marzony (2009). Este evento é resultado de altos níveis de ROS ou baixos níveis de antioxidantes (SONG; NORKUS; LEWIS, 2006).

A existência fisiológica de ROS no sêmen é vital para a proliferação e diferenciação espermática que são controladas pela presença de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos presentes tanto na célula espermática quanto no PS (SHAMSI et al., 2009). Como antioxidantes enzimáticos temos a superóxido dismutase, o sistema glutatona peroxidase/glutathione redutase e a catalase (NICHII, 2003); como não enzimáticos podemos citar o α – tocoferol (Vitamina E) e o ácido ascórbico (MATES, 2000; SONG; NORKUS; LEWIS, 2006).

Além de antioxidante, estudos mostraram que a vitamina E aumenta a motilidade espermática e ela é usada para a espermatogênese de acordo com a espécie. Em diferentes espécies a deficiência de vitamina E causa degeneração do epitélio germinativo (REKKAS et al., 2000). Song, Norkus e Lewis, (2006) mostraram que homens inférteis apresentam níveis baixos de ácido ascórbico e correlacionaram com danos no DNA espermático.

Todos estes antioxidantes agem prevenindo ao quelarem os metais de transição, interferindo ao quebrar as reações em cadeia e reparando as reações de peroxidação,

porém por falta de sistema de enzimas citoplasmáticas o reparo não é possível em células espermáticas (NICHII, 2003).

O espermatozóide é particularmente vulnerável a este evento, pois sua membrana plasmática é rica em PUFA's e pobre em antioxidantes no seu citoplasma (NICHII, 2003). O dano causado na membrana leva a alterações de morfologia e motilidade. Esses efeitos deletérios causados pelas ROS ocorrem quando há um desequilíbrio entre elas e os antioxidantes durante a maturação espermática no epidídimo ou quando há um distúrbio no plasma seminal, de acordo com Shamsi et al. (2009).

Este evento não afeta somente a fluidez e a regulação da espermatogênese, mas também a integridade do DNA do núcleo espermático, induz dano celular acelerando o processo de apoptose da célula germinativa, declínio da concentração espermática associada com a infertilidade e aparente deterioração da qualidade seminal e capacidade do espermatozóide sofrer reação acrossômica e fertilizar (LI; SHANG; CHEN, 2004; KASIMANICKAM et al., 2006; SONG; NORKUS; LEWIS, 2006; VENKATESH et al., 2009), por causar danos em diversas biomoléculas tais como lipídios, amino ácidos, carboidratos, proteínas e no DNA (VENKATESH et al., 2009).

As ROS são produtos do metabolismo mitocondrial e entre elas, as mais importantes são a radical hidroxila (OH^\cdot), o ânion superóxido (O_2^\cdot), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO_2) (NICHII, 2003; BAPTISTA SOBRINHO, 2009). Dessas, a mais agressiva é a radical hidroxila que se forma a partir de todas as outras ROS (NICHII, 2003).

Quando esse estresse ocorre na molécula de lipídio dizemos que está ocorrendo uma peroxidação lipídica e como principal produto desse evento temos a formação de uma substância chamada Malondialdeído (MDA), relata Nielsen et al. (1997).

2.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PERFORMANCE (High Performancy Liquid Chromatography – HPLC)

Técnica utilizada para a separação de componentes de uma mistura, baseada na distribuição destes entre uma fase estacionária e uma móvel, sendo um método ideal para a separação de espécies iônicas ou macromoléculas de interesse biológico e produtos naturais lábeis (COLLINS, 1995).

A fase estacionária pode ser um sólido ou um líquido e a fase móvel pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico. Esta, considerada um solvente, passa sobre a estacionária, arrastando consigo os diversos componentes da mistura e deve apresentar como característica principal não provocar nenhuma interação química ao dissolver a amostra. Os solventes mais utilizados são: água, metanol e acetonitrila (PERES, 2002).

Os componentes de um cromatógrafo líquido são: bomba, coluna cromatográfica, detector e o registrador. Estudos realizados com sêmen humano usaram o detector de UV, pois relatam que esse é o mais sensível na detecção de uma variedade maior de AG (GRIZARD et al., 2000; LI; SHANG; CHEN, 2004).

Levando em consideração a sensibilidade do aparelho muitos estudos estão sendo realizados com sua utilização e a detecção de lipídios como fez Browne e Armstrong (2000) ao mensurar os produtos da peroxidação lipídica no plasma humano em pacientes com arteriosclerose. Nielsen et al. (1997) mensurou MDA no plasma sanguíneo em fumantes.

Em sêmen podemos citar Chakroun Feki et al. (2004) que mensurou lipídios no sêmen humano após migração em muco cervical. Li, Shang e Chen (2004) mensurou MDA e Grizard et al. (2000) mensurou fosfolipídios, ambos no sêmen humano.

Objetivo

3 OBJETIVOS

Considerando a influência exercida pelos lipídios sobre o metabolismo espermático e sobre a fertilidade dos animais, este projeto visou:

- Determinar um método prático de extração de lipídios do plasma seminal de carneiros, viabilizando a possibilidade de estabelecer seu perfil lipídico através da Cromatografia Líquida de Alta Performance.

- Determinar um método prático de extração de lipídios do pellet de espermatozoides de carneiros, viabilizando a possibilidade de estabelecer seu perfil lipídico através da Cromatografia Líquida de Alta Performance.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta seção explica os diferentes métodos de extração para a determinação do perfil lipídico do sêmen ovino.

4.1 LOCAL E PERÍODO EXPERIMENTAL

As coletas foram realizadas na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, bairro Cidade Universitária, a cidade de São Paulo, no Estado de São Paulo, Brasil. Este procedimento foi cumprido durante 12 meses escolhidos aleatoriamente entre os 24 meses que compreende o mestrado, proporcionando assim a não interferência sazonal das coletas.

4.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E MANEJO

Foram utilizados 7 carneiros da raça Santa Inês e mestiços, com idade entre 3 a 5 anos, mantidos em estabulação coletiva, em baias de alvenaria divididas em 2 ambientes interligados de 3m x 4,06 m e 3 m x 5,82 m totalizando uma área de 29,64 m², sob as mesmas condições de manejo e alimentação, contendo cocho, bebedouro e cama de maravalha trocada diariamente. Alimentam – se de feno à vontade e ração comercial, esta composta por: Milho integral moído, Farelo de trigo, Farelo de algodão, Farinha de ossos calcinados, Carbonato de cálcio, Cloreto de sódio – sal comum e premix vitamínico mineral, 1 vez por dia e água *ad libitum*.

Todos os animais passaram por uma avaliação preliminar, para avaliação da integridade dos testículos, epidídimo, sistema locomotor, sanidade geral e escore corporal, garantindo a perfeita saúde dos carneiros durante o período de coletas.

4.3 COLETA DE SÊMEN

Os animais foram contidos e após limpeza do prepúcio e pênis com água corrente e secagem com papel toalha, o sêmen foi coletado pela técnica da vagina artificial, utilizando-se de uma fêmea fora do estro, como manequim. A amostra foi coletada em tubo coletor graduado em mililitros e previamente aquecido a 37°C, protegido com tecido (feltro ou flanela), evitando o contato direto com a luz e o choque térmico, que pode ocasionar a morte dos espermatozóides (GRANADOS et al, 2006). Após a coleta o tubo foi mantido em banho-maria a 37°C até ser processado.

4.4 PROCESSAMENTO INICIAL DAS AMOSTRAS

O sêmen foi avaliado quanto à presença ou não de espermatozóides e quanto à motilidade, vigor e turbilhonamento. E então, foi centrifugado a 8000g por 15 minutos, separando-se a amostra em duas alíquotas, uma correspondente ao plasma seminal e outra ao pellet de espermatozóides, que foram guardados em eppendorfs separados e armazenados em freezer comum.

Foram realizadas 10 coletas, totalizando 40 amostras, entre elas 20 alíquotas de plasma seminal e 20 de pellet de espermatozóides. Destas, 10 amostras de plasma seminal e 10 de espermatozóides tiveram seus lipídios extraídos pelo método 1 e o restante pelo método 2.

4.5 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS ESPERMÁTICOS E DO PLASMA SEMINAL

Foi realizada a extração lipídica através de dois métodos Folch (1957) modificados diferentes para posterior análise do perfil lipídico no HPLC e comparação entre eles.

4.5.1 Extração de lipídios – método 1

Este primeiro método consistiu em separar dois eppendorfs que foram devidamente identificados. No primeiro eppendorf colocou-se 10µL de plasma seminal ou 20mg do pellet de espermatozóide. A amostra foi homogeneizada com 20x este volume em metanol e clorofórmio (1:2), por 20 minutos e então foi centrifugado a 700G por 10 minutos, à temperatura ambiente. O sobrenadante (fase líquida) foi recuperado para o segundo eppendorf, no qual foi adicionado ¼ do volume de solução aquosa de cloreto de potássio (KCl) 0,88%, para retirada das impurezas. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a baixa rotação de 2000 rpm por 10 minutos, para separação das amostras. O sobrenadante foi desprezado por aspiração e ao restante foi adicionado ¼ do volume de metanol e água (1:1), sem misturar o conteúdo. A fração superior formada foi desprezada por aspiração e o restante foi submetido à secagem com vapor de nitrogênio. Após a secagem a amostra pode ser saponificada imediatamente ou pode ser armazenada em freezer comum até seu próximo processamento.

4.5.2 Extração de lipídios – método 2

Da mesma forma, 2 eppendorfs foram separados e devidamente identificados. No primeiro eppendorf colocou-se 10 μ L de plasma seminal ou 20mg do pellet de espermatozóide. À amostra foi adicionado 1 ml de metanol para ser homogeneizada e passada no vórtex. Posteriormente, adicionou-se 1 ml de clorofórmio e 0,4 ml de água MiliQ, e então foi novamente homogeneizado e passado no vórtex por aproximadamente 15 segundos. Havendo então a formação de um halo branco, separando a amostra em duas fases. Aproximadamente 1 ml da fase inferior foi aspirado e colocado no segundo eppendorf para ser armazenado em gelo, enquanto aguarda. Ainda no primeiro eppendorf, realizou-se uma segunda extração adicionando 0,5 ml de metanol, 0,5 ml de clorofórmio e água MiliQ até completar o tubo. A mistura foi homogeneizada e passada no vórtex por aproximadamente 15 segundos. A fração superior foi desprezada por aspiração e o conteúdo restante foi misturado ao segundo eppendorf que estava armazenado em gelo. No segundo eppendorf foi adicionado 0,5ml da Mistura de Folch que consiste em clorofórmio: metanol: água (3: 48: 47), e então passado no vórtex. Novamente a fração superior foi desprezada por aspiração e o restante da amostra foi submetido à secagem por vapor de nitrogênio. Após a secagem a amostra pode ser saponificada imediatamente ou pode ser armazenada em freezer comum até seu próximo processamento.

4.5.3 Saponificação

Todas as amostras secas foram ressuspensas em 1 ml de NaOH:Metanol (Anexo A) e passadas pelo vórtex. Após foram transferidas para um tubo de vidro previamente lavado com solução de potassa (Anexo B). Vedou-se esse tubo para que as amostras fossem mantidas por 2 horas em banho-maria a 37°C. Posteriormente,

adicionou-se 2 ml de HCl, para neutralizar e acidificar as amostras, que foram passadas no vórtex.

Mais 1 ml de Hexano foi adicionado e novamente passado no vórtex. A camada superior formada foi recuperada com pipeta e transferida a um outro eppendorf, esta camada corresponde à camada de Hexano contendo a fração lipídica.

Repetir esta etapa mais uma vez, no mesmo tubo de vidro e colocar o sobrenadante no mesmo eppendorf.

As amostras foram secadas no fluxo de N₂, para posterior derivatização.

4.5.4 Derivatização e Cromatografia

A derivatização procedeu-se ressuspendendo as amostras secas em 100 µl de Acetonitrila (ACN), o mesmo solvente usado na fase móvel, posteriormente passado no vórtex. Após adicionou-se 20 µl do reagente 1 (Anexo C) e 20 µl do reagente 2 (Anexo D) em 40 µl de amostra em tubo redutor de volume que foi tampado, vortecado e incubado a 65°C por 15 minutos em banho seco e somente após este procedimento a amostra foi analisada pelo HPLC.

O cromatógrafo líquido utilizado foi um Shimazu com as seguintes condições cromatográficas para o método de separação de mistura de ácidos graxos serão: fluxo de 1 ml por minuto, fase móvel composta por A = ACN (77%) e B= água (23%). Utilizou-se coluna C8 Supelco, coluna de fase reversa com sílica mantida à temperatura ambiente e com pressão de 60 Kg/cm².

A detecção empregará o detector de fluorescência com os respectivos comprimentos de onda de excitação e de emissão, 325 nm e 395 nm.

Padrões de ácidos graxos:

Serão utilizados os seguintes padrões de ácidos graxos:

- Ácido Capróico (C3);
- Ácido Caprílico (C6);
- Ácido Cáprico (C10);
- Ácido Láurico (C12);
- Ácido Mirístico (C14);
- Ácido Palmítico (C16);
- Ácido Palmitoléico (C16);
- Ácido Margárico (C17);
- Ácido Oléico (C18);
- Ácido Esteárico (C18);
- Ácido Linoléico (C18:2);
- Ácido Linolênico (C18);
- Ácido Araquidônico (C20:4);
- Ácido Eicosapentaenóico (C20);
- Ácido Docosaheptaenóico (C22:6);

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (2000).

Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas foram transformados (logarítmo na base 10 – $\log_{10} X$; Raiz quadrada – \sqrt{X} ; Quadrado – X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica (teste de Wilcoxon). A análise paramétrica foi realizada através do teste t de Student.

Para descrição dos resultados, foram empregados os erros padrões e as médias (média \pm erro padrão da média) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis. Todas as variáveis resposta avaliadas obedeceram às premissas.

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta.

As variáveis classificatórias utilizadas foram matriz (espermatozóide vs. plasma seminal) e método de extração dos lipídeos (extração 1 vs. Extração 2).

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão foram colocados no mesmo capítulo para melhor entendimento.

5.1 EFEITO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÕES SOBRE OS ÁCIDOS GRAXOS NO ESPERMATOZÓIDE

Os resultados mostraram que a extração 1 é melhor em relação a extração 2 tanto em quantidade, como na identificação de diferentes AG, uma vez que o segundo método não identificou os seguintes AG: caprótico, caprílico, cáprico e margárico. Porém, ambos os métodos não identificaram o EPA e o linolênico. Isto pode ter ocorrido devido a armazenagem das amostras. Lahnsteiner et al. (2009) observou que havia maior quantidade de lipídios em amostras frescas em relação a amostras congeladas e relacionou este resultado com uma possível metabolização.

Além disso, há maior concentração de AG totais nas amostras de espermatozoides da extração 1, em relação à extração 2 ($339,62 \pm 53,37$ versus $157,86 \pm 44,55$, respectivamente, Tabela 1). Provavelmente o tempo de ação de metanol:clorofórmio na amostra não foi suficiente para a extração de maior quantidade de AG, já que na extração 1 é necessário deixar agir por 20 minutos antes de passar para o próximo passo e na extração 2, essas substâncias agem por no máximo 1 minuto.

Tabela 1 -Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a concentração (ng/g) dos ácidos graxos dos espermatozóides avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo – 2008 a 2009.

	Extração 1	Extração 2	P
Capróico	0,01 ± 0,01	0	0,3739
Caprílico	0,3 ± 0,1	0	0,0392
Cáprico	0,04 ± 0,04	0	0,3739
Láurico	4,77 ± 1,52	3,35 ± 1,58	0,5331
Mirístico	31,21 ± 7,76	14,47 ± 5,94	0,1253
Palmítico	54,43 ± 5,81	24,02 ± 4,89	0,0039
Margárico	0,09 ± 0,09	0	0,3739
Estearico	21,12 ± 2,47	7,92 ± 2,48	0,0055
EPA	0	0	-
Linolênico	0	0	-
DHA	168,18 ± 28,76	81,58 ± 20,78	0,0405
Araquidônico	12,35 ± 1,90	5,54 ± 1,81	0,0317
Palmitoleico	3,8 ± 0,95	1,37 ± 0,96	0,1096
Linoleico	35,15 ± 8,84	16,53 ± 5,98	0,1192
Oleico	8,7 ± 1,09	3,08 ± 1,30	0,0173
TOTAL	339,62 ± 53,37	157,86 ± 44,55	0,0309

Há maior concentração de AG saturados e insaturados obtidos pela extração 1, em relação a extração 2 ($111,96 \pm 13,95$ e $227,66 \pm 40,23$ versus $49,75 \pm 14,58$ e $108,10 \pm 30,16$, respectivamente, Figura 1), confirmando o resultado obtido na tabela 1.

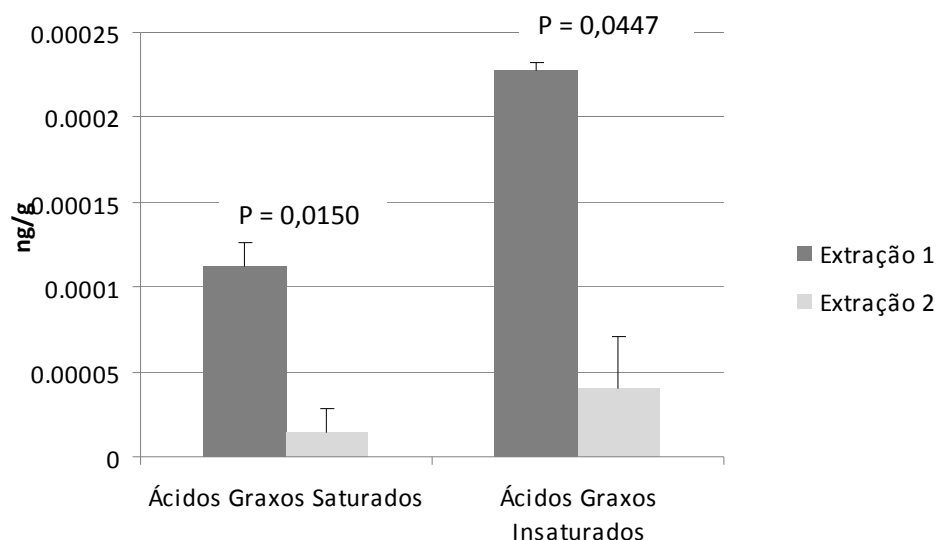


Figura 1 -Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a concentração (ng/g) do total de ácidos graxos saturados e insaturados dos espermatozóides avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo – 2008 a 2009

Embora a extração 1 consiga maior quantidade de AG no espermatozóide, a extração 2 mantém a proporção dos AG identificados em relação ao primeiro processo. Apesar de não detectar alguns lipídios com concentração baixa como o caprílico, caprílico e o cáprico, conseguiu identificar AG importantes como o DHA e o aracdônico (Tabela 2). Desta forma, a extração 2 seria suficiente para comparar 2 amostras pela proporção de AG.

Tabela 2 -Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a porcentagem dos ácidos graxos dos espermatozoides avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo – 2008 a 2009

	Extração 1	Extração 2	P
Capróico (%)	0,003 ± 0,003	0	0,3739
Caprílico (%)	0,11 ± 0,04	0	0,0719
Cáprico (%)	0,02 ± 0,02	0	0,3739
Láurico (%)	1,37 ± 0,31	1,76 ± 0,49	0,5274
Mirístico (%)	9,21 ± 1,44	8,45 ± 0,93	0,6674
Palmítico (%)	16,70 ± 1,15	16,57 ± 1,33	0,9440
Margárico (%)	0,04 ± 0,04	0	0,3739
Estearico (%)	6,6 ± 0,74	4,98 ± 0,57	0,1240
EPA (%)	0	0	-
Linolênico (%)	0	0	-
DHA (%)	49,03 ± 1,97	53,07 ± 2,96	0,2895
Araquidônico (%)	3,68 ± 0,2	3,34 ± 0,17	0,2269
Palmitoleico (%)	1,05 ± 0,14	0,54 ± 0,33	0,1964
Linoleico (%)	9,71 ± 1,86	9,65 ± 1,75	0,9828
Oleico (%)	2,45 ± 0,10	1,63 ± 0,42	0,1218

A mesma proporção é mantida quando se pensa em AG saturados e insaturados em ambas as extrações (Figura 2).

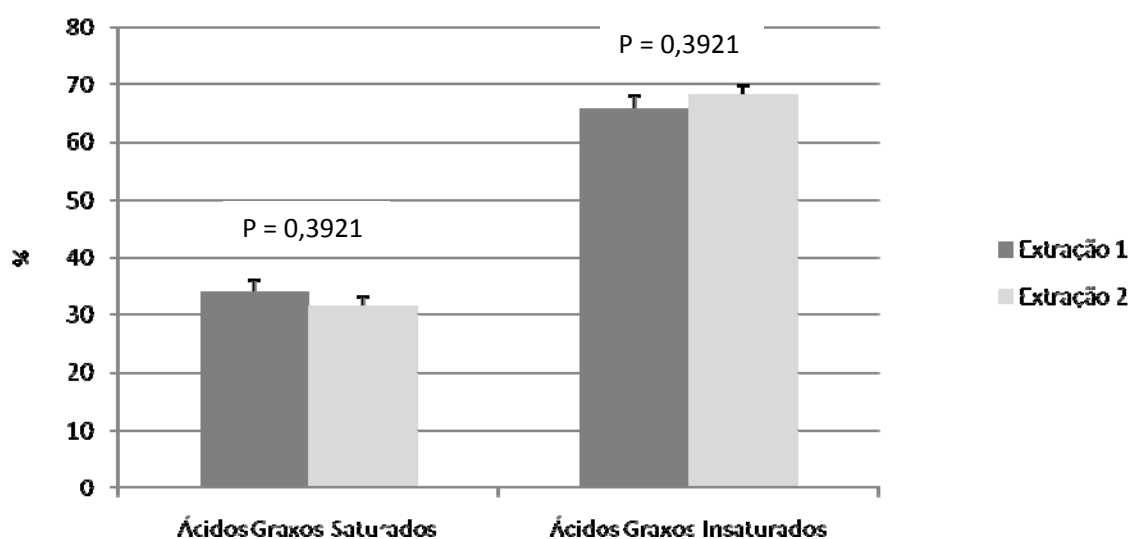


Figura 2 -Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a porcentagem do total de ácidos graxos saturados e insaturados dos espermatozoides avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo – 2008 a 2009

5.2 EFEITO DOS MÉTODOS DE EXTRAÇÕES SOBRE OS ÁCIDOS GRAXOS NO PLASMA SEMINAL

Apesar de não ter sido possível realizar a estatística destas amostras, ambas as extrações são semelhantes em valores e em identificação de AG diferentes, pois as

duas extrações não identificaram AG como o araquidônico e palmitoléico (Tabela 3). Porém este dado é controverso, uma vez que o araquidônico é um importante AG precursor da prostaglandina, substância presente no plasma de acordo com Salamon (1990). Blesbois (1997) observou altas concentrações deste AG juntamente com o DHA em galos.

Tabela 3 -Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a concentração (ng/ml) dos ácidos graxos do plasma seminal avaliado através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo – 2008 a 2009

	Extração 1	Extração 2	P
Capróico	0	0	-
Caprílico	0	0	-
Cáprico	0	0	-
Láurico	2,20 ± 0,9	7,11 ± 0	-
Mirístico	1,53 ± 0,56	0	-
Palmítico	11,15 ± 2,77	11,32 ± 0	-
Margárico	0	0	-
Esteárico	4,88 ± 1,34	8,31 ± 0	-
EPA	0	0	-
Linolênico	0	0	-
DHA	6,38 ± 2,51	1,83 ± 0	-
Araquidônico	0	0	-
Palmitoleico	0	0	-
Linoleico	0,39 ± 0,39	5,12 ± 0	-

Oleico	0,76 ± 0,45	16,64 ± 0	-
TOTAL	27,29 ± 7,61	50,34 ± 0	-

Não houve diferença entre AG saturados e insaturados no plasma seminal para os dois métodos (Figura 3).

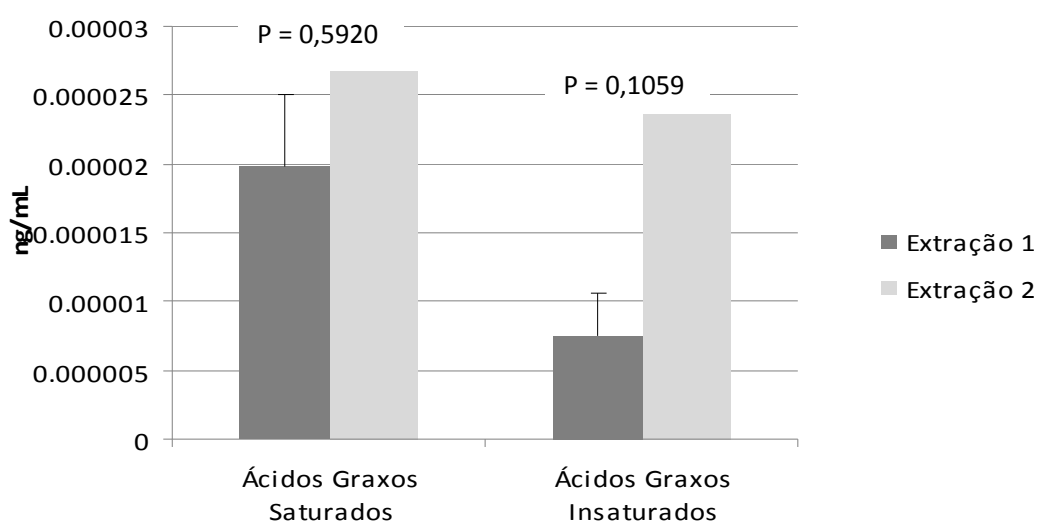


Figura 3 -Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a concentração (ng/ml) do total de ácidos graxos saturados e insaturados do plasma seminal avaliado através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo – 2008 a 2009

Embora não seja possível realizar a estatística, podemos afirmar que há maior porcentagem de DHA no plasma seminal na extração 1, em relação a extração 2 ($25,75 \pm 7,72$ versus $3,64 \pm 0$, respectivamente, Tabela 4). Também observamos maiores valores do palmítico (AG saturado) na extração 1 e oléico (AG insaturado) na extração 2. Mesmo havendo essas diferenças, os dois métodos são suficientes para determinar a proporção de AG também no plasma seminal.

Tabela 4 -Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a porcentagem dos ácidos graxos do plasma seminal avaliado através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo – 2008 a 2009

	Extração 1	Extração 2	P
Capróico (%)	0	0	-
Caprílico (%)	0	0	-
Cáprico (%)	0	0	-
Láurico (%)	7,37 ± 3,59	14,13 ± 0	-
Mirístico (%)	4,59 ± 1,57	0	-
Palmítico (%)	41,78 ± 1,56	22,49 ± 0	-
Margárico (%)	0	0	-
Estearico (%)	17,46 ± 2,07	16,51 ± 0	-
EPA (%)	0	0	-
Linolênico (%)	0	0	-
DHA (%)	25,75 ± 7,72	3,64 ± 0	-
Araquidônico (%)	0	0	-
Palmitoleico (%)	0	0	-
Linoleico (%)	0,85 ± 0,85	10,16 ± 0	-
Oleico (%)	2,17 ± 1,26	33,36 ± 0	-

Não houve diferença estatística entre os dois métodos para a extração de AG saturados e AG insaturados (Figura 4), o que reafirma a possibilidade de uso do método 2 para verificar proporção de AG também no plasma seminal.

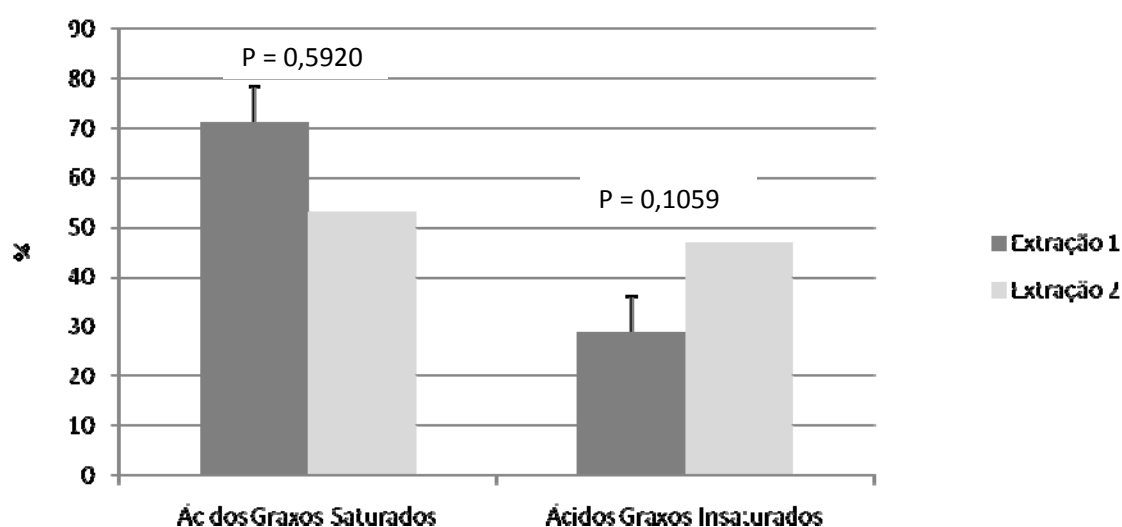


Figura 4 -Efeito dos métodos de extração (extração 1 e extração 2) sobre a porcentagem dos ácidos graxos do plasma seminal avaliado através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros - São Paulo – 2008 a 2009

Em ambas as extrações há maior quantidade de AG totais no espermatozóide, em relação ao plasma seminal. Barrios et al. (2000) relata que o plasma seminal melhora a viabilidade do espermatozóide em ovinos por ser uma mistura complexa que contém grandes quantidade de proteínas que protege o espermatozóide de lesões associadas ao estresse térmico e oxidativo. Esta mistura de muitas substâncias pode prejudicar a extração sendo necessárias mais lavagens da amostra para retirada de impurezas.

5.3 ÁCIDOS GRAXOS NO ESPERMATOZÓIDE E NO PLASMA SEMINAL – EXTRAÇÃO 1

Os resultados apresentaram maior concentração de AG totais na amostra de espermatozóides, em relação ao plasma seminal ($63,15 \pm 9,92$ versus $5,07 \pm 1,41$, respectivamente, Tabela 5). Dado explicado pela constituição biológica do plasma seminal, predominante de proteínas como relatou Martins (2006) ao estudar as concentrações de proteínas no plasma seminal de bodes.

Os espermatozóides apresentaram maiores concentrações de DHA, em relação ao plasma seminal ($168,18 \pm 28,76$ versus $6,38 \pm 2,51$, respectivamente, Tabela 1), além de este ser quase 50% dos AG totais. Em concordância com este trabalho Aksoy (2006) obteve altas concentrações de DHA no espermatozóide de homens normozoospermicos. Estes dados explicam porque a célula espermática é tão susceptível ao estresse oxidativo, que tem como principal alvo os lipídios e o DNA. Dentre os lipídios, os AG insaturados são os mais atingidos já que a dupla ligação deixa a molécula mais frágil, grupo em que se encaixa o DHA. Este é indispensável para manter a fluidez de membrana, aumentar motilidade e induzir reação acrossomal (ROOKE; SHAO; SPEAKE, 2001).

Embora o ácido araquidônico não tenha sido identificado no plasma, vimos anteriormente que este resultado é controverso. Além disso, sua presença é importante, pois também está relacionado com motilidade espermática e indução de reação acrossomal, de acordo com Hossain (2007).

Tabela 5 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a concentração (ng/g e ng/ml, respectivamente) dos ácidos graxos avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 1 - São Paulo – 2008 a 2009

	Espermatozóide	Plasma Seminal	P
Capróico	0,01 ± 0,01	0	0,3739
Caprílico	0,3 ± 0,1	0	0,0392
Cáprico	0,04 ± 0,04	0	0,3739
Láurico	4,77 ± 1,52	2,20 ± 0,9	0,2176
Mirístico	31,21 ± 7,76	1,53 ± 0,56	0,0185
Palmítico	54,43 ± 5,81	11,15 ± 2,77	0,0005
Margárico	0,09 ± 0,09	0	0,3739
Estearico	21,12 ± 2,47	4,88 ± 1,34	0,0011
EPA	0	0	-
Linolênico	0	0	-
DHA	168,18 ± 28,76	6,38 ± 2,51	0,0048
Araquidônico	12,35 ± 1,90	0	0,0029
Palmitoleico	3,8 ± 0,95	0	0,0161
Linoleico	35,15 ± 8,84	0,39 ± 0,39	0,0170
Oleico	8,7 ± 1,09	0,76 ± 0,45	0,0007
TOTAL	339,62 ± 53,37	27,29 ± 7,61	0,0039

Dentre os AG saturados e insaturados, há maior concentração no espermatozóide, em relação ao plasma seminal, utilizando a extração 1 ($111,96 \pm 13,94$ e $227,66 \pm 40,23$ versus $19,76 \pm 5,22$ e $7,53 \pm 3,13$, respectivamente, Figura 5), dado também relacionado à constituição do plasma seminal, além de a célula espermática ser constituída de fosfolipídios principalmente, fator que torna o gameta ainda mais susceptível ao efeito das ROS. Aksoy (2006) ainda relata que defeitos da função espermática é a causa mais comum de infertilidade e acredita-se que o estresse oxidativo tem grande influência nessas funções e seus principais alvos são o DNA e a membrana lipídica.

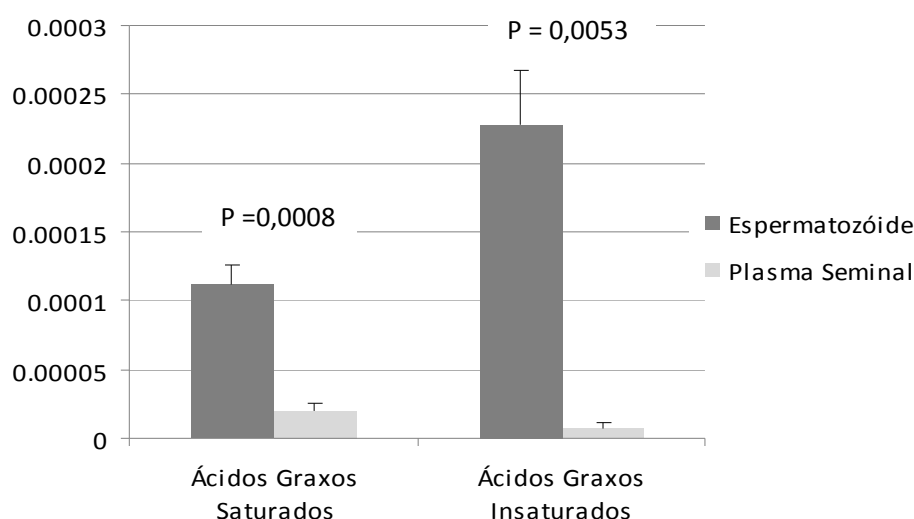


Figura 5 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a concentração (ng/g e ng/ml, respectivamente) do total de ácidos graxos saturados e insaturados avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 1 - São Paulo – 2008 a 2009

Os resultados apresentaram maior porcentagem de DHA na amostra de espermatozóides, em relação ao plasma seminal ($49,03 \pm 1,97$ versus $25,75 \pm 7,72$, respectivamente, Tabela 6). Há maior porcentagem do AG Palmítico no plasma seminal, em relação ao espermatozóide ($41,78 \pm 1,56$ versus $16,70 \pm 1,15$,

respectivamente, Tabela 6), em concordância com Khosrowbeygi e Zarghami (2007) que observou maior quantidade do ácido palmítico em homens normozoospermicos em relação aos outros grupos.

Tabela 6 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a porcentagem dos ácidos graxos avaliados pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 1 - São Paulo – 2008 a 2009

	Espermatozóide	Plasma Seminal	P
Capróico (%)	0,003 ± 0,003	0	0,3739
Caprílico (%)	0,11 ± 0,04	0	0,0719
Cáprico (%)	0,02 ± 0,02	0	0,3739
Láurico (%)	1,37 ± 0,31	7,37 ± 3,59	0,1932
Mirístico (%)	9,21 ± 1,44	4,59 ± 1,57	0,0671
Palmítico (%)	16,70 ± 1,15	41,78 ± 1,56	<0,0001
Margárico (%)	0,04 ± 0,04	0	0,4071
Estearico (%)	6,6 ± 0,74	17,46 ± 2,07	0,0010
EPA (%)	0	0	0
Linolênico (%)	0	0	0
DHA (%)	49,03 ± 1,97	25,75 ± 7,72	0,0529
Araquidônico (%)	3,68 ± 0,2	0	<0,0001
Palmitoleico (%)	1,05 ± 0,14	0	0,0016
Linoleico (%)	9,71 ± 1,86	0,85 ± 0,85	0,0055
Oleico (%)	2,45 ± 0,10	2,17 ± 1,26	0,8384

A porcentagem de AG saturados é menor e de AG insaturados é maior no espermatozóide, em relação ao plasma seminal ($34,05 \pm 2,06$ e $65,95 \pm 2,06$ versus $71,21 \pm 7,19$ e $28,78 \pm 7,19$, respectivamente, Figura 6), assim como observou Khosrowbeygi e Zarghami (2007). Estes dados indicam novamente o motivo de o espermatozóide sofrer estresse oxidativo, o que causa danos funcionais e morfológicos.

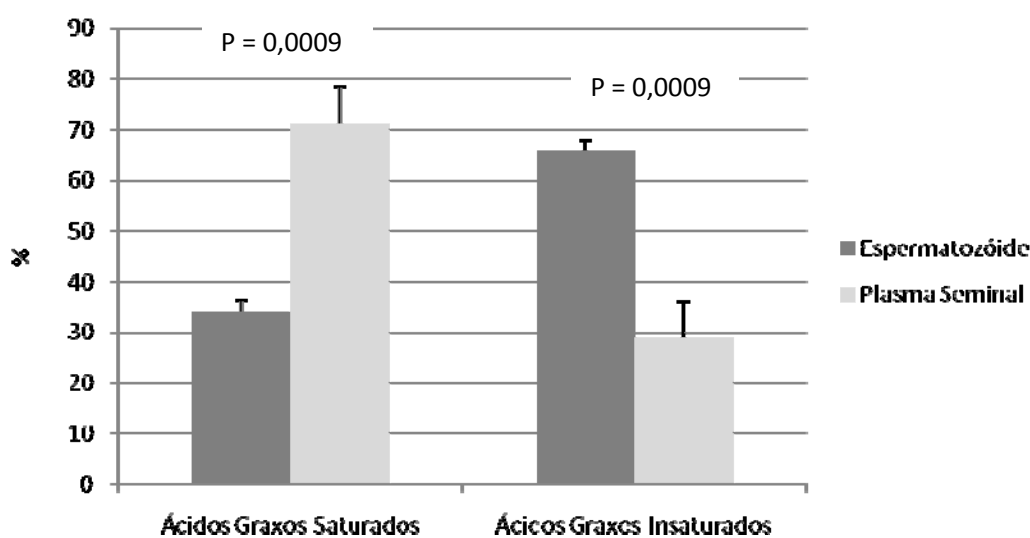


Figura 6 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a porcentagem do total de ácidos graxos saturados e insaturados avaliados pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 1 - São Paulo – 2008 a 2009

5.4 ÁCIDOS GRAXOS NO ESPERMATOZÓIDE E NO PLASMA SEMINAL – EXTRAÇÃO 2

Mesmo não sendo possível realizar a estatística, os resultados se mostram muito semelhantes no espermatozóide e no plasma seminal, havendo apenas o DHA em

maior concentração na amostra de espermatozoides, em relação ao plasma seminal ($81,58 \pm 20,78$ versus $0,34 \pm 0$, respectivamente, Tabela 7). Este AG corresponde a mais de 50% dos AG totais. O DHA é a mais importante PUFA do espermatozoide, sendo um dos principais alvos do estresse oxidativo, além do DNA como relata Nichi (2003). Aksoy et al. (2006) também observou altas concentrações de DHA em homens normozoospermicos em relação a outros grupos com patologias, o que sugere a função crucial deste AG na fluidez do espermatozoide e na habilidade fertilizante.

Tabela 7 - Efeito da matriz (espermatozoide e plasma seminal) sobre a concentração (ng/g e ng/ml, respectivamente) dos ácidos graxos avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 2 - São Paulo – 2008 a 2009

	Espermatozoide	Plasma Seminal	P
Capróico	0	0	-
Caprílico	0	0	-
Cáprico	0	0	-
Láurico	$3,35 \pm 1,58$	$1,32 \pm 0$	-
Mirístico	$14,47 \pm 5,94$	0	-
Palmítico	$24,02 \pm 4,89$	$2,10 \pm 0$	-
Margárico	0	0	-
Estearico	$7,92 \pm 2,48$	$1,54 \pm 0$	-
EPA	0	0	-
Linolênico	0	0	-
DHA	$81,58 \pm 20,78$	$0,34 \pm 0$	-
Araquidônico	$5,54 \pm 1,81$	0	-

Palmitoleico	1,37 ± 0,96	0	-
Linoleico	16,53 ± 5,98	0,95 ± 0	-
Oleico	3,08 ± 1,30	3,09 ± 0	-
TOTAL	157,86 ± 44,55	9,36 ± 0	-

Dentre os AG saturados e insaturados, há maior concentração no espermatozóide, em relação ao plasma seminal, utilizando a extração 2 ($49,75 \pm 14,58$ e $108,10 \pm 30,16$ versus $26,75 \pm 0$ e $23,59 \pm 0$, respectivamente, Figura 7). Comprovando novamente a constituição da membrana espermática.

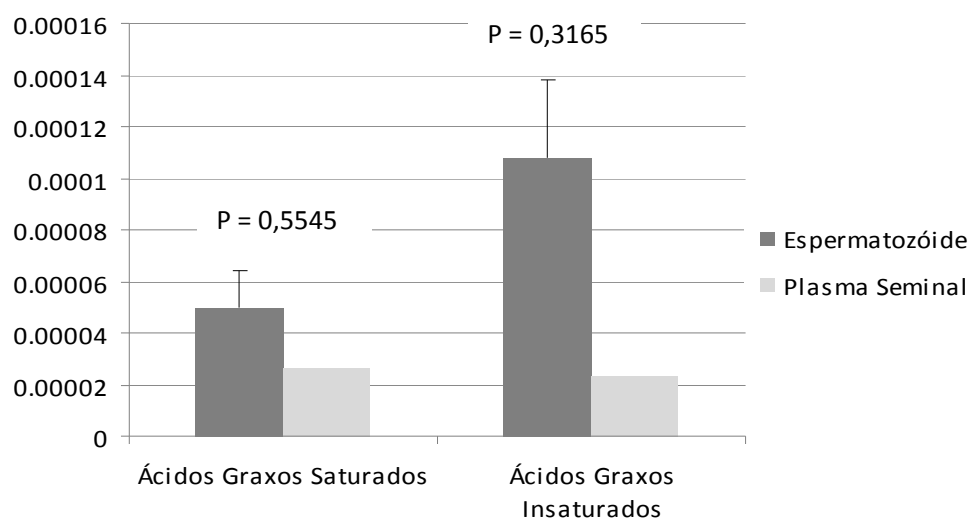


Figura 7 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a concentração (ng/g e ng/ml, respectivamente) do total dos ácidos graxos saturados e insaturados avaliados através da área dos picos obtidos pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 2 - São Paulo – 2008 a 2009

Embora não seja possível a realização da estatística há maior porcentagem de DHA na amostra de espermatozóides, em relação ao plasma seminal ($53,07 \pm 2,96$

versus $3,64 \pm 0$, respectivamente, Tabela 8) e maior porcentagem do AG oléico no plasma seminal em relação ao espermatozóide ($33,36 \pm 0$ versus $1,63 \pm 0,42$, respectivamente, Tabela 8).

Tabela 8 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a porcentagem dos ácidos graxos avaliados pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 2 - São Paulo – 2008 a 2009

	Espermatozóide	Plasma Seminal	P
Capróico (%)	0	0	-
Caprílico (%)	0	0	-
Cáprico (%)	0	0	-
Láurico (%)	$1,76 \pm 0,49$	$7,11 \pm 0$	-
Mirístico (%)	$8,45 \pm 0,93$	0	-
Palmítico (%)	$16,57 \pm 1,33$	$11,32 \pm 0$	-
Margárico (%)	0	0	-
Estearico (%)	$4,98 \pm 0,57$	$8,31 \pm 0$	-
EPA (%)	0	0	-
Linolênico (%)	0	0	-
DHA (%)	$53,07 \pm 2,96$	$1,83 \pm 0$	-
Araquidônico (%)	$3,34 \pm 0,17$	0	-
Palmitoleico (%)	$0,54 \pm 0,33$	0	-
Linoleico (%)	$9,65 \pm 1,75$	$5,12 \pm 0$	-
Oleico (%)	$1,63 \pm 0,42$	$16,64 \pm 0$	-

A porcentagem de AG saturados é menor no espermatozóide, em relação ao plasma seminal ($31,76 \pm 1,46$ versus $53,13 \pm 0$, respectivamente, Figura 8). Entretanto, a porcentagem de AG insaturados é menor no plasma seminal, em relação ao pellet de espermatozóides ($68,23 \pm 1,46$ versus $46,87 \pm 0$).

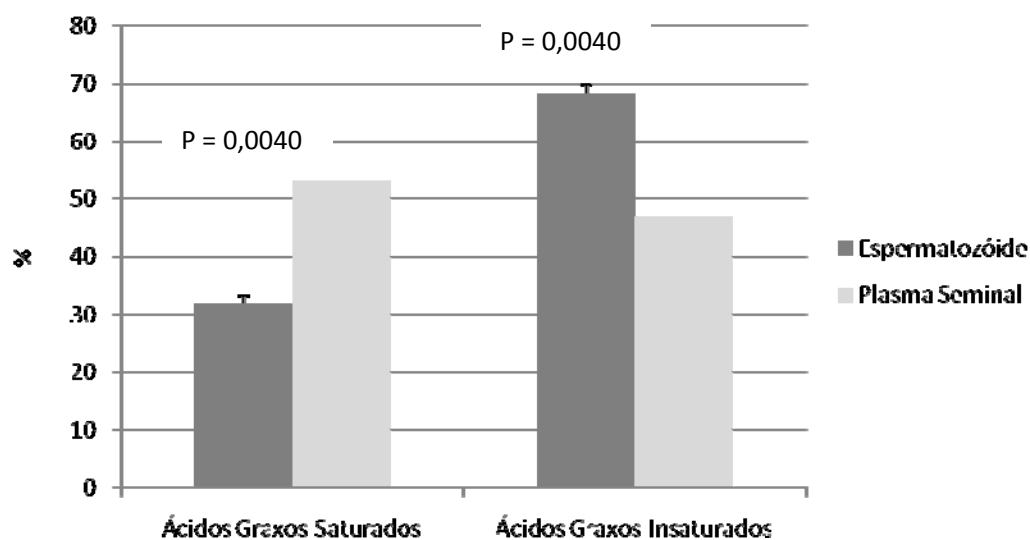


Figura 8 - Efeito da matriz (espermatozóide e plasma seminal) sobre a porcentagem do total de ácidos graxos saturados e insaturados avaliados pela Cromatografia Líquida de Alta Performance em amostras espermáticas de carneiros, utilizando o método de extração 2 - São Paulo – 2008 a 2009

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Logo, concluímos que a composição de AG do espermatozóide e do plasma seminal são semelhantes, embora alguns AG de baixa concentração (cáprico, caprílico e capróico) não tenham sido identificados no plasma seminal. O AG saturado predominante no espermatozóide é o mirístico e o AG insaturado predominante é o DHA, em ambas as extrações. No plasma seminal, nos dois métodos, o AG saturado que prevalece é o palmítico e o insaturado é o oléico.

Também podemos concluir que a extração 1 é mais efetiva na identificação e na quantificação do perfil lipídico, em relação a extração 2.

Referências

REFERÊNCIAS

AKSOY, Y.; AKSOY, H.; ALTINKAYNAK, K.; AYDIN, H. R.; OZKAN, A. Sperm fatty acid composition in subfertile men. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 75, n. 2, p. 75-79, 2006.

BAPTISTA SOBRINHO, C. A. **Efeito do tratamento na qualidade de espermatozoides criopreservados de cães**. 2009. 54f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BLESBOIS, E.; LESSIRE, M.; GRASSEAU, I.; HALLOUIS, J. M.; HERMIER, D. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. **Biology of reproduction**, v. 56, n.1, p. 1216-1220, 1997.

BLIGH, E.G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, Aug. 1959.

BROWNE, R. W.; ARMSTRONG, D. HPLC Analysis of Lipid-derived polyunsaturated fatty acid peroxidation products in oxidatively modified human plasma. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 829-836, 2000.

BUKAR, M. N.; ATESSAHIN, A.; VARISH, O.; YUCE, A.; TEKIN, N.; AKCAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1060-1067, 2007.

CASTELLINI, C.; CARDINALI, R.; DAL BOSCO, A.; MINELLI, A.; CAMICI, O. Lipid composition of the main fractions of rabbit semen. **Theriogenology**, v. 65, n. 4, p. 703-712, 2006.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T. M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v. 121, n. 3, p. 395–401, 2001.

CHAKROUN FEKI, N.; THÉRON, P.; COUNTURIER, M.; LIMÉA, G.; LEGRAND, A.; JOUANNET, P.; AUGER, J. Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 2, p. 137-142, 2004.

CLARENBERG, R. **Physiological chemistry of domestic animals**. St. Louis: Mostry, 1992. p. 292-296: Lipid metabolism.

COLAGAR, A. H.; MARZONY, E. T. Ascorbic acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 45, n. 2, p. 144-149, 2009.

COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução aos métodos cromatográficos**. 6.ed. Sao Paulo: UNICAMP, 1995, p. 11-26.

COOPER, G. M. **The cell: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1996. 673 p.

CROSS, N. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 1, p. 7-11, 1998.

DERIVAUX, J. **Reprodução dos animais domésticos**. 1.ed. Espana: Editorial Acribia, 1980. 446 p.

DUFOR, J. J.; FAHMY, M. H.; MINVIELLE, F. Seasonal changes in breeding activity, testicular size, testosterone concentration and seminal characteristics in rams with long or short breeding season. **Journal of Animal Science**, v. 58, n. 2, p. 416-422, 1984.

DURAN DEL CAMPO, A. **Anatomia, fisiologia da reprodução e inseminação artificial em ovinos**. Montevideo: Editorial Agropecuaria Hemisferio SUR, 1980, 254 p.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. **Steven Salamon**: inseminacion artificial de ovejas y cabars. 1.ed. Espanã: Editorial Acribia, 1990. 192 p.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

GORDON, I. **Controlled reproduction in farm animals series**: controlled reproduction in sheep and goats. 1.ed. New York: CABI Publishing, 1999, 450 p.

GRANADOS, L. B. C.; DIAS, A. J. B.; SALES, M. P. **Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos**. 1.ed. Campos de Goytacazes – RJ: [s.n], 2006. Projeto PROEX/UENF. 54 p.

GRIZARD, G.; SION, B.; BAUCHART, D.; BOUCHER, D. Separation and quantification of cholesterol and major phospholipid classes in human semen by high-performance liquid chromatography and light-scattering detection. **Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications**, v. 740, n. 1, p. 101-107, 2000.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, 2004, 513 p.

HATAMOTO, L. K.; SOBRINHO, C. A. B.; NICHI, M.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermogram and seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1610-1614, 2006.

HINKOVSKA-GALCHEVA, V.; PETKOVA, D.; KOUMANOV, K. Changes in the phospholipids asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 26, n. 1, p. 70-75, 1989.

HOLT, W. V. The sperm plasma membrane. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON HUMAN SPERM ACROSSOME REACTION, PHYSIOLOGICAL AND PHARMACOLOGICAL INDUCTION AND TRANSDUCTION PATHWAYS, 1995, França. **Proceedings...**

HOSSAIN. S.; TAREK, K. M. A.; HAMMANO K. I.; TSUJII H. Effect of fatty acids on boar sperm motility viability and acrosome reaction. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 6, n. 4, p. 235-239, 2008.

KASIMANICKAM, R.; PELZER, K. D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W. S.; THATCHER, C. D. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, v. 65, n. 7, p. 1407-1421, 2006.

KHOSROWBEYGI, A.; ZARGHAMI, N. Fatty acid composition of human spermatozoa and seminal plasma levels of oxidative stress biomarkers in subfertile males. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, n. 2, p. 117-121, 2007.

LEHNINGER, A. L. Lipídios e Membranas. In: LEHNINGER A. L. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1986, 725 p.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 3, p. 246-256, 1996.

LI, K.; SHANG, X.; CHEN, Y. High-performance liquid chromatographic detection of lipid peroxidation in human seminal plasma and its application to male fertility. **Clinica Chimica Acta**, v. 346, n. 2, p. 199-203, 2004.

LIMA, R. A. S. A concentração geográfica da produção de ovinos: comparativo dos resultados dos censos 1995/96 e 2006. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL (SOBER), 2008, Rio Branco. Disponível em:

<<http://www.sober.org.br/palestra/9/767.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2009.

MARTINS, L. F.; PEREIRA, M. C. B.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P.; SILVEIRA, T.S.; TORRES, C. A. A.; RODRIGUES, M. T.; BRAZ, V. B. Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n. 4, p. 1653-1659, 2006.

MARTINS, R. D.; MCMANUS, C.; CARVANHEDO, A. S.; BORGES, H. V.; FELICIANO SILVA, A. E. D.; RIBEIRO SANTOS, N. Avaliação da sazonalidade reprodutiva de carneiros Santa Inês criados no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 6, p. 1594-1603, 2003. (Suplemento 1).

MATES, J. M. Effects of antioxidant enzymes in molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 1-3, p. 83-104, 2000.

MIES FILHO, A.; BARRETO, J. F. Biologia do espermatozóide. Estudo de sêmen objetivando a prática da inseminação artificial (Tecnologia do sêmen I). In: FILHO, A. M.; BARRETO, J. F. **Noções sobre reprodução dos animais e inseminação artificial**. 9.ed. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura – Serviço de Informação Agrícola, 1949. P. 162-185.

MOBINI, S.; HEATH, A. M.; POUGH, D. G. Teriogenologia de ovinos e caprinos. In: POUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2004. p. 145-208.

NIELSEN, F.; MIKKELSEN, B. B.; NIELSEN, J. B.; ANDERSEN, H. R.; GRANDJEAN, P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and affects of life-style factors. **Clinical Chemistry**, v. 43, n. 7, p. 1209-1214, 1997.

NICHI, M. **Sistemas de produção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003. 101f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

OLIVEIRA, M. P. Análise do crescimento do rebanho ovinos e caprinos no Brasil. 01 dez 2008. Disponível em:

<<http://www.farmpoint.com.br/?actA=9&erroN=1&areaID=14&referenciaURL=noticialID=50070||actA=7||areaID=1||secaoID=8>>. Acesso em: 15 nov. 2009.

OLIVEIRA, S. L.; FIALHO, E. T.; MURGAS, L. D. S.; FREITAS, J. A.; FREITAS, R. T. S.; ZANGERONIMO, M. G. Efeito da inclusão de diferentes tipos de óleo na dieta de varrões sobre a qualidade do sêmen "in natura". **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1205-1210, 2006.

OLLERO, M.; POWERS, R. D.; ALVAREZ, J. G. Variation of decosahecanoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 1, p. 326-334, 2000.

O'RAND, M. G. Modification of sperm membrane during capacitation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 383, n. 1, p. 392-404, 1982.

PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 653-668, 1985.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and roosters sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 1, p. 255-266, 1992.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 227-229, jul./dez., 2002.

PÉREZ-PÉ, R.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUINO-BLANCO, T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, n. 3, p. 425-234, 2001.

RANA, A. P. S; MAJUMDER, G. C. Lipid phase transition in the plasma membrane of the goat epididymal maturing spermatozoa. **Journal of Biosciences**, v. 20, n. 4, p. 525-530, 1995.

REKKAS, C.; KOKOTIS, N.; BELIBASAKI, S.; TSANTARLIOTOU, M.; SMOKOVITIS, A. Effects of α – tocopherol on plasma testosterone and plasminogen activator activity or inhibition in ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, p. 751-760, 2000.

ROOKE, J. A.; SHAO, C. C.; SPEAKE, B. K. Effects os feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and *in vitro* characteristics of semen. **Reproduction**, v. 121, n. 6, p. 315-322, 2001.

SALAMON, S. Semen y SUS características. In: ____ **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza (Espanã): Editorial Acribia, 1990, p. 25-33.

SHAMZI M, B.; VENKATESH, S.; TANWAR, M.; TALWAR, P.; SHARMA, R. K.; DHAWAN, A.; KUMAR, R.; GUPTA, N. P.; MALHOTRA, N.; SING, N.; MITTAL, S.; DADA, R. DNA integrity and semen quality in men with low seminal antioxidant levels. **Mutation Research**, v. 665, n. 1-2, p. 29-36, 2009.

SONG, G. J.; NORKUS, E. P.; LEWIS, V. Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. **International Journal of Andrology**, v. 29, n. 1, p. 569-575, 2006.

VENKATESH, S.; RIYAZ, A. M.; SHAMSI, M. B.; KUMAR, R.; GUPTA, N. P.; MITTAL, S.; MALHOTRA, N.; SHARMA, R. K.; AGARWAL, A.; DADA, R. Clinical significance of reactive oxygen species in semen of infertile Indian men. **Andrologia**, v. 41, n. 4, p. 251-156, 2009.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes In: MORRIS, E. J.; CLARCK, A. (Ed.). **The effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981, p. 189-218.

WATSON, P. F. Recents developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their postthawing function. **Reproduction, Fertility and Development** v. 7, n. 1, p. 871-891, 1995.

WISCHRAL, A. **Concentrações plasmáticas de progesterona, estradiol - 17 β , PGFM e PGEM relação com a atividade de enzimas antioxidantes e perfil lipidico da**

placenta em vacas com e sem retenção placentária. 1998. 93f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1998.

Anexos

ANEXO A

Solução de NaOH:Metanol

NaOH 0,5M em Metanol 90%

NaOH PM = 40

2g NaOH em 10 ml de água, solubilizar e adicionar metanol q.s.p. 100 ml.

ANEXO B

Solução de Potassa

Metanol + KOH a 2% =

2 g KOH para 100 ml Metanol

Lavar o tubo normalmente e após passar água destilada. Então lavar com a solução de potassa, passar novamente água destilada e deixar secar em estufa a 37°C.

ANEXO C

Reagente 1

10 mg (0,01g) de Bromometil metoxi cumarin, dissolvidos em 10 ml de ACN estocado e protegido da luz.

ANEXO D

Reagente 2

26,5 mg (0,027g) de 18 – Crown – 6 – ether em 5 ml de ACN adicionado de 100 mg de carbonato de potássio e 50 µl de água, sonicar por 30 minutos. Adicionar 5 ml de ACN e decansar por 20 segundos. O sobrenadante deve ser separado da fase sólida do carbonato de potássio e guardado de 4 a 8°C.
