MARIANA APARECIDA FONSECA

Análise do perfil lipídico do sêmen bovino

São Paulo

2012

MARIANA APARECIDA FONSECA

Análise do perfil lipídico do sêmen bovino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós–Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador

Prof° Dr° Felipe Perecin

São Paulo
2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2559
FMVZ

Fonseca, Mariana Aparecida
Análise do perfil lipídico do sêmen bovino / Mariana Aparecida Fonseca. -- 2012.
63 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Perecin.

1. Lipídeos. 2. Bovino. 3. Espermatozoide. 4. Espectrometria de massas. I. Título.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – ÁREA: ANIMAL

Processo USP nº: 2012.1.169.74.2

Data de entrada: 12/01/2012

Pesquisadores: Prof. Dr. Felipe Perecin

Currículo(s) do(s) pesquisador(es): Todos os pesquisadores envolvidos possuem currículo Lattes.

PARECER

Título do Projeto: Análise do perfil lipídico do sêmen bovino.

Apreciação Geral: O projeto apresenta grande relevância no contexto da pecuária nacional, pois pretende desenvolver e testar uma nova metodologia (pela técnica de espectrometria de massas) para a análise e identificação de biomarcadores lipídicos para fertilidade em espermatozoides bovinos.

Introdução: Projeto bem fundamentado e atual.

Metodologia: Amostras de sêmen congelado serão classificadas retrospectivamente pela análise dos dados de fertilidade a campo das mesmas. As partidas de alta e baixa fertilidade serão processadas e analisadas pela técnica espectrometria de massas (MALDI-Q-TOF) para a busca de biomarcadores lipídicos.

Aspectos Éticos: O presente projeto não apresenta nenhuma discordância em relação as normas e recomendações da Resolução Nº 592 do CFMV de junho de 1992 e dos Princípios Éticos na experimentação animal, do COBEA. As amostras de sêmen serão provenientes de partidas comerciais já congeladas em Centrais de Reprodução Animal. Neste projeto, nenhum dos pesquisadores terá contato efetivo com animais.

Outros Comentários: Nada a comentar.

Esclarecimentos Necessários: Nenhum esclarecimento se faz necessário.

Pelo Comitê de Ética:

☒ **Referendado.**

☐ **Não referendado.**

☐ **Retirado de pauta.**

Pirassununga, 27 de fevereiro de 2012.

Notifique-se o interessado.

Prof. Dr. Marco Antonio Trindade - Suplente do Presidente em Exercício do CEP/FZEA

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Fonseca, Mariana Aparecida

Título: Análise do perfil lipídico do sêmen bovino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós–Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres 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: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Dedico,

A meus pais, Vicente e Cirlene, pelo carinho, amizade e amor. Por serem responsáveis pelo que eu sou e por sempre acreditarem no meu sucesso.

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

À Deus, por estar comigo em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, pela oportunidade de realização deste trabalho de pesquisa.

Ao Prof. Felipe Perecin, pela oportunidade, pelo apoio e orientação.

À CNPQ pela bolsa cedida, possibilitando a realização deste Mestrado.

Aos meus pais, Vicente e Cirlene, pelo apoio e incentivo, à minha Irma Ana Carolina que torce por mim.

À Dr. Christina Ramires Ferreira pela ajuda nas análises e obtenção dos espectros, pela disponibilidade e boa vontade em nos ajudar.

Ao Laboratório Thomson do Instituto de Química da UNICAMP, pela realização das análises e pela obtenção das amostras.

Ao Prof. Dr. Rubens Paes Arruda, pela colaboração com as amostras de sêmen para análise.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

FONSECA, M. A. **Análise do perfil lipídico do sêmen bovino**. [Analysis of the lipid profile of bovine semen]. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A composição dos lipídeos de membrana está entre os fatores que podem influenciar a capacidade fecundante do espermatozoide. Sabidamente os lipídeos desempenham papéis indispensáveis na membrana dos espermatozoides, participando dos processos de interação entre gametas e influenciando o comportamento físico-químico dos espermatozoides durante os procedimentos de criopreservação. Estas moléculas apresentam uma ampla gama de propriedades químicas que tornam complexa a sua análise. Atualmente a espectrometria de massas (MS) por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) representa uma potente ferramenta para a análise de lipídeos. Assim, a proposta deste trabalho buscou verificar a ocorrência de diferença no perfil lipídico de espermatozoides bovinos obtidos por MALDI utilizado técnica de análise direta dos espermatozoides e análise após a extração lipídica pelo método de Bligh e Dyer. Além disso, este trabalho analisou o perfil lipídico de espermatozóides bovinos que receberam ou não suplementação de antioxidantes. Após coleta, lavagem e separação dos espermatozoide, estes foram submetidos à extração lipídica ou destinados íntegros à obtenção do perfil lipídico (método direto). O perfil lipídico do extrato lipídico ou de espermatozoides íntegros foi adquirido por MALDI em modo positivo e com matriz DHB (ácido dihidroxibenzoico). A análise dos dados foi realizado com o software Metaboanalist utilizando ferramentas de análise multivariada (análise de componentes principais – PCA) e de identificação de íons com intensidade diferencial entre grupos de comparação (teste t, volcano plot). Com essas análises foi possível identificar que ocorre diferença no perfil lipídico dos espermatozoides bovinos quando obtidos a partir de análise direta ou extração de lipídeos. Não foram observadas diferentes entre grupos submetidos ou não à suplementação com vitaminas. O método direto é capaz de proporcionar um perfil lipídico representativo e de fácil aquisição.

Palavras-chave: Lipídeos. Bovino. Espermatozoide. Espectrometria de massas.

ABSTRACT

FONSECA, M. A. **Analysis of the lipid profile of bovine semen**. [Análise do perfil lipídico do sêmen bovino]. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The membrane lipid composition is amongst the factors that influence the fertilization competence of the spermatozoa. It is also known that lipids play fundamental roles at spermatozoa membranes, participating in many processes, such as spermatozoa-oocyte interaction and determining the physical-chemical behavior of spermatozoa membranes during cryopreservation. These molecules show a wide range of chemical properties, making complex its analysis. Currently, mass spectrometry (MS) through matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) represents a powerful tool for lipids analysis. Hence, this proposal aimed to evaluate differences in bovine spermatozoa lipid profile obtained through MALDI using direct sample analysis of spermatozoa or analysis of spermatozoa lipid extract obtained by Bligh-Dyer technique. Moreover, this proposal evaluated lipid profile of spermatozoa from bull that received or not antioxidant supplementation. After collection, washing and separation, the spermatozoa were submitted to lipid extraction or straightforward destined to lipid profile acquisition (direct method). The lipid profiles of spermatozoa lipid extracts or from whole spermatoloza were obtained by MALDI in positive mode with DHB matrix (dihydrozybenzoic acid). Data analysis was performed with Metaboanalyst software using multivariated analysis (Principal component analysis – PCA) and tools for identification of differential ions between comparison groups (t-test, volcano plot). Results show differences in spermatozoa lipid profile obtained by direct method or after lipid extraction. No differences were observed in bovine spermatozoa derived from bulls supplemented or not with vitamins. The direct method can generate a representative and easily obtained lipid profile.

Keywords: Lipids. Bovine. Spermatozoa. Mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Evolução de doses de sêmen comercializadas nos 3 últimos anos..... **15**

Figura 2 - Comercialização de sêmen de animais de corte em 2011..... **15**

Figura 3 - Esquema das etapas do trabalho desde a obtenção das amostras até a obtenção dos dados..... **37**

Figura 4 - Animais selecionados para o grupo controle (parte superior) e para o grupo tratado (parte inferior) na 1° e na 2° fase das coletas. Os dias, indicados na parte superior de cada seta, mostram os tratamentos com as vitaminas A, D e E e o dia de cada coletas dos sêmens, parte inferior das setas..... **39**

Figura 5 - PCA demonstrando as separações através do perfil lipídico das amostras de sêmen após análise direta (vermelho) ou após a extração lipídica (verde)..... **42**

Figura 6 - Pontuação VIP identificando os principais íons diferenciais entre os perfis lipídicos das amostras de sêmen obtidas por análise direta ou por extração lipídica..... **42**

Figura 7 - O espectro A representa o perfil lipídico da análise após a extração lipídica, e o espectro B mostra o perfil lipídico da análise direta pelo método de Bligh e Dyer..... **43**

Figura 8 - PCAs demonstrando as separações através do perfil lipídico das amostras de sêmen de animais controle (vermelho) e tratados (verde)..... **45**

Figura 9 - A figura representa as características importantes selecionados pelo t-testes com nível de significância de 5%. Os círculos vermelhos representam íons acima do limiar..... **46**

Figura 10 - Os círculos vermelhos representam íons acima do limiar. O fold change e os valores de p são transformados em log. As posições mais distantes do (0,0) são mais significantes..... **47**

Figura 11 - Os espectros representam os principais perfis lipídicos dos sêmens de animais controles (A e B) e de animais tratados (C e D)..... **48**

Figura 12 - PCAs demonstrando as separações através do perfil lipídico das amostras de sêmen de animais controle (vermelho) e tratados (verde) **51**

Figura 13 - A figura representa as características importantes selecionados pelo t-testes com nível de significância de 5%. Os círculos vermelhos representam íons acima do limiar..... **52**

Figura 14 - Os círculos vermelhos representam íons acima do limiar. O fold change e os valores de p são transformados em log. As posições mais distantes do (0,0) são mais significantes..... **53**

Figura 15 - Os espectros representam os principais perfis lipídicos dos sêmens de animais controles (A e B) e de animais tratados (C e D) **54**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais íons e suas devidas classificações identificados no perfil lipídico do sêmen com suplementação de vitaminas A, D e E pelos métodos utilizados e representados pelos espectros..... **49**

Quadro 2 - Principais íons e suas devidas classificações identificados por animal durante o período de coletas pelos métodos utilizados e representados pelos espectros..... **55**

SUMÁRIO

1 **INTRODUÇÃO.** 15

2 **REVISÃO DE LITERATURA** 18

2.1 IMPORTÂNCIA DA RAÇA NELORE 18

2.2 PAPEL DOS LIPÍDIOS DE MEMBRANA NO SÊMEN 18

2.3 TESTES DE AVALIAÇÃO DO SÊMEN 21

2.4 A ESPECTROMETRIA DE MASSAS 24

2.5 ANÁLISE DE SÊMEN UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS 25

2.6 ANTIOXIDANTES 26

2.7 FOSFOLIPÍDIOS 27

2.7.1 Fosfatidilcolina (FC) 27

2.7.2 Esfingomielina (SM) 28

2.7.3 Fosfatidiletanolamina (PE) 29

2.7.4 Fosfatidilglicerol (PG) 30

2.7.5 Ácido Fosfatídico (PA) 31

2.7.6 Lisofosfatidilcolina (LPC) 31

2.7.7 Lisofosfatidiletanolamina (LPE) 32

2.7.8 Ácido Lisofosfatídico (LPA) 32

2.7.9 Fosfatidilinositol (PI) 33

2.7.10 Fosfatidilserina (PS) 34

3 **OBJETIVOS** 35

3.1 OBJETIVO GERAL 35

3.2 **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** 35

4 **MATERIAL E MÉTODOS** 36

4.1 COLETA DE SÊMEN, LAVAGEM DOS ESPERMATOZÓIDES E ARMAZENAMENTO 36

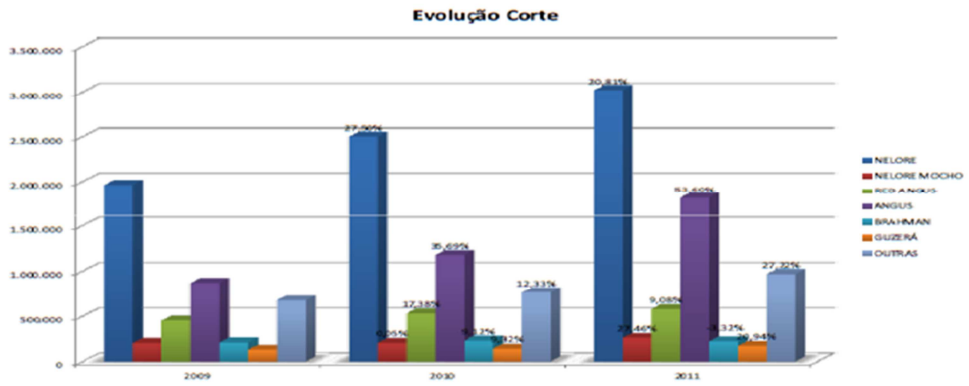
4.2 ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO DO SÊMEN ÍNTEGRO E DO EXTRATO LIPÍDICO DO SÊMEN 36

4.3 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS..... 37
4.4 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES NA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO SÊMEN..... 38
4.5 OBTENÇÃO DOS PERFIS LIPÍDICOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ANÁLISE DOS DADOS..... 39
4.6 ANÁLISES UTILIZANDO OS MÉTODOS FORNECIDOS PELO METABOANALYST..... 40
5 **RESULTADOS E DISCUSSÃO.....** 41
5.1 PERFIL LIPÍDICO DE AMOSTRAS SUBMETIDAS OU NÃO À EXTRAÇÃO LIPÍDICA..... 41
5.2 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINAS A, D E E NO PERFIL LIPÍDICO DO SÊMEN..... 44
5.3 ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO POR ANIMAL DURANTE O PERÍODO DE COLETAS..... 50
6 **CONCLUSÃO.....** 57
REFERÊNCIAS..... 58

1 INTRODUÇÃO

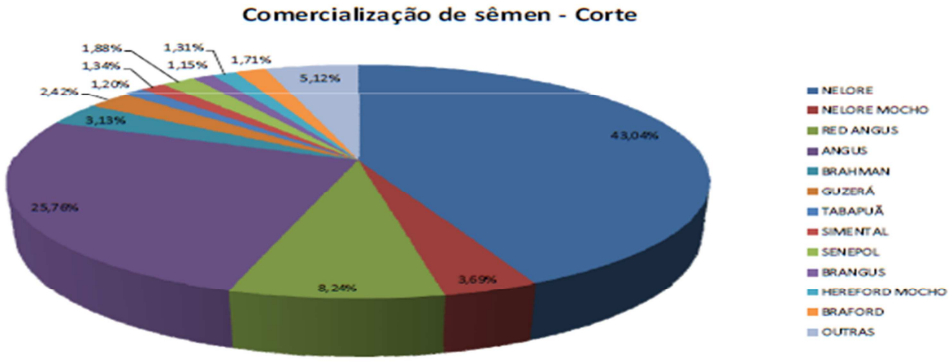
Segundo a ASBIA (Associação Brasileira de Inseminação Artificial) a Inseminação Artificial no Brasil e o número de doses comercializadas vêm crescendo nos últimos anos como demonstra a figura 1. Dentre as raças comercializadas, destacam-se os touros Nelores, que representam aproximadamente 43% do mercado de doses de sêmen (Figura 2; ASBIA, 2011).

Figura 1 - Evolução de doses de sêmen comercializadas nos 3 últimos anos



. Fonte: ASBIA, 2011

Figura 2 - Comercialização de sêmen de animais de corte em 2011



Fonte: ASBIA, 2011

.

Aguiar (2010) afirma que o agronegócio é hoje a principal locomotiva de economia brasileira e o Brasil lidera o ranking das vendas externas de carne bovina. O desenvolvimento científico-tecnológico e a adoção de programas de sanidade animais obtidos através de pesquisas contribuíram para transformar o país numa das maiores plataformas mundiais do agronegócio. Esse prestígio adquirido pela pecuária brasileira acelerou a busca por novas tecnologias relativas à melhoria das pastagens, nutrição, genética, reprodução e o aumento do melhoramento genético dos rebanhos. Sendo assim, é muito importante o controle da qualidade do sêmen para garantir a efetividade do processo reprodutivo e bons resultados.

De acordo com Cardoso (2009), o sêmen é dividido em duas partes: o espermatozoide que é formado de ácidos nucléicos, proteínas e lipídios, colesterol e fosfolipídios presentes na membrana espermática, alem de possuir uma cápsula lipoide ao seu redor que tem função protetora e de resistência, e o plasma seminal, que atua como veículo para os espermatozoides, participando da sua ativação e proporcionando um meio rico de nutrientes.

A membrana plasmática é a parte da estrutura do espermatozoide mais susceptível a modificações durante o processo de criopreservação, e sua integridade é fundamental para que os espermatozoides estejam viáveis no momento da fecundação. Sua composição, tipo de fosfolipídeos e quantidade de proteínas são variáveis. Enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal e no próprio espermatozoide neutralizam os metabólitos, evitando o estresse oxidativo e danos à composição lipídica da membrana (BORGES et al., 2011).

Os lipídeos apresentam uma ampla gama de propriedades químicas que tornam a sua análise bastante exigente. Atualmente a espectrometria de massas (MS) por ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-MS) representa uma potente ferramenta para a análise de lipídeos, oferecendo também a possibilidade de identificação estrutural molecular usando a espectrometria de massas *in tandem* (MALDI-MS/MS; STÜBIGER; BELGACEM, 2007).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: a dos com atividade enzimática e a dos sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de

bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (MOREIRA et al., 2004).

A composição dos lipídeos de membrana está entre os fatores que podem influenciar a capacidade fecundante do sêmen. Os lipídeos sabidamente desempenham papéis indispensáveis na membrana dos espermatozoides, participando dos processos de interação entre gametas e influenciando o comportamento físico-químico dos espermatozoides durante os procedimentos de criopreservação (FERREIRA et al., 2009).

Assim, este trabalho busca analisar o perfil lipídico do sêmen bovino através da espectrometria de massas como técnica analítica. Os resultados desse projeto contribuirão para o desenvolvimento de técnicas de análise de sêmen bovino baseados na espectrometria de massas, capazes de determinar a composição lipídica dos espermatozoides, correlacionando-as com sua capacidade funcional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA RAÇA NELORE

A raça bovina Nelore é uma raça zebuína pertencente à subespécie *Bos taurus indicus*. Os zebuínos são originários do sul do continente asiático, e chegaram à América trazida pelos colonizadores. Dentre as variedades zebuínas trazidas para o Brasil, o Nelore é a que vem sofrendo maior intensidade de seleção. Algumas características do gado Nelore que o tornam tão popular entre os criadores são a habilidade para aproveitamento das forragens, mesmo grosseiras, a agilidade dos bezerros e a fertilidade de vacas e touros (GLASER, 2007).

A raça Nelore predomina atualmente no cenário pecuário brasileiro, representando 80% da força produtiva da indústria da carne no país. As características da raça como produtora de carne vêm apresentando índices de desempenho econômicos notáveis (GLASER, 2007). Atualmente, esta raça tem sido melhorada geneticamente sendo destinada para a produção de carne (RIPAMONTE, 2002).

A reprodução é um processo complexo e a seleção direta de características ligadas à reprodução é, muitas vezes, difícil de ser aplicada. Por isso, torna-se necessário identificar características que sejam facilmente mensuradas, que apresentem variabilidade e que sejam geneticamente correlacionadas aos eventos reprodutivos. Dessa forma, a associação entre duas ou mais características, observadas em indivíduos de uma população, torna-se ferramenta nos processos de seleção (DIAS et al., 2008).

2.2 PAPEL DOS LIPÍDEOS DE MEMBRANA NO SÊMEN

As membranas dos espermatozoides, compostas de uma mistura heterogênea de fosfolipídios, glicolipídeos e esteroides (PARKS; LYNCH, 1992), desempenham importantes papéis em eventos chave no metabolismo espermático,

tais como a capacitação espermática, a reação acrossomal e a interação entre espermatozoide e óvulo (ZALATA et al., 1998). Além disso, a composição da membrana é um dos fatores determinantes das propriedades físico-químicas e tolerância dos gametas à criopreservação (JANETT et al., 2003; CEROLINI et al., 2009).

Os fosfolipídeos são os lipídeos mais abundantes na membrana espermática. São formados por uma cabeça polar e duas caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicas. As caudas usualmente são ácidos graxos e podem diferir em comprimento. Uma cauda geralmente tem uma ou mais duplas ligações *cis* (insaturada), enquanto a outra cauda não contem insaturações (saturada). Diferenças no comprimento e saturação das caudas de ácidos graxos são importantes, porque influenciam a capacidade das moléculas de fosfolipídeos de agrupar-se umas às outras, e por essa razão afetar a fluidez da membrana. O conteúdo de colesterol também influencia a fluidez da membrana por tornar a bicamada lipídica menos deformável e consequentemente diminuir a permeabilidade da bicamada a pequenas moléculas hidrossolúveis (SIQUEIRA, 2004).

Os ácidos graxos poliinsaturados (*polyunsaturated fatty acids* – PUFA) são considerados essenciais, pois os mamíferos são incapazes de sintetizá-los e, contribuem para a fluidez e flexibilidade da membrana. Os ácidos linoléico e (18:2 n-6) e linolénico (18:3 n-3) são sintetizados a partir de ácidos graxos de cadeia longa com 20 e 22 átomos de carbono. As três famílias de PUFAs são classificadas de acordo com a distância da primeira dupla ligação em relação ao terminal metil – n-3, n-6 e n-9. PUFAs da série n-3 são essenciais para a atividade reprodutiva e representam cerca de 30-50% do total de ácidos graxos presentes na membrana dos espermatozoides. Os componentes contendo os ácidos n-6, biologicamente ativos, são utilizados durante o processo de maturação espermática, enquanto aqueles contendo ácidos graxos n-3 serviriam para manter a integridade do espermatozoide ejaculado (SHIROMA; ZÚCCARI, 2009).

A difusão de lipídeos na membrana plasmática de espermatozoides vivos varia significativamente entre os domínios de superfície, por causa da heterogeneidade da composição ou diferença na disposição da bicamada, ou ainda

devido à presença de barreiras intra-membranosas que impedem a troca livre entre os domínios. Essa informação enfatiza a importante função dos lipídeos de membrana em regular a migração polarizada de antígenos da superfície espermática durante o processo de desenvolvimento tais como maturação e capacitação (CELEGHINI, 2005).

A função das membranas é determinada pela interação de seus vários componentes; desse modo, algum evento que modifique estas interações pode alterar sua função. A manutenção do estado líquido dos lipídeos e das proteínas de membrana permite a movimentação livre dos componentes, o que garante suas interações. As interações entre as proteínas e lipídeos que ocorrem dentro da membrana são extremamente importantes para o desempenho das funções celulares. Alguns lipídeos são preferencialmente agrupados ao redor de proteínas de membrana integrais e o ambiente lipídico ao redor de uma proteína influencia as propriedades funcionais da unidade agregada (CELEGHINI, 2005).

A composição lipídica do esperma é um pré-requisito importante para entender o impacto na cascata de processos que o espermatozoide tem que passar antes da fertilização. Para ampliar os dados da variação lipídica dos espermas pode ser utilizada a espectrometria de massas por MALDI-TOF que é um método sensível e prático que concede diversas informações (FUCHS et al., 2008).

Assim, a estrutura espermática e o potencial de fertilização dependem da composição lipídica da membrana celular espermática e do plasma seminal (BEER-LJUBIC et al., 2009). Entretanto existem poucos estudos acerca da composição dos lipídeos de membrana em espermatozoides bovinos (PARKS et al., 1987), e não existem publicações correlacionando a fertilidade de touros com a composição de membrana dos espermatozoides.

Na membrana das células, os ácidos graxos são elementos estruturais e compostos bioativos. Em muitas espécies, os fosfolipídios são os principais componentes lipídicos dos espermatozoides, caracterizados por terem grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados. Em alguns mamíferos, o ácido docosa-hexanoico é o ácido graxo poli-insaturado dominante, embora em outras

espécies o ácido docosapentanoico seja o principal componente da membrana espermática. Com relação à constituição da membrana celular, o aumento na proporção de poli-insaturados nos espermatozoides, durante sua fase de maturação no epidídimo, pode ter efeito pronunciado nas propriedades físicas e químicas da membrana. Desse modo, a inclusão de óleos na ração pode modificar o perfil de ácidos graxos dos espermatozoides e, consequentemente, melhorar a qualidade espermática. Os ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 (ω3) predominam nos fosfolipídios das membranas celulares de cuja permeabilidade e flexibilidade. Mesmo apresentando efeitos benéficos nos ácidos graxos ω3, a presença de alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados dentro das frações lipídicas dos espermatozoides torna-os altamente susceptíveis à peroxidação, com consequente risco de danos à estrutura celular. Portanto, há necessidade de um sistema antioxidante para protegê-los contra danos peroxidativos bem como contra uma possível disfunção dessas células. Acredita-se que os danos causados pela peroxidação dos lipídios dos espermatozoides sejam a principal causa de subfertilidade dos machos (MORAES et al., 2010).

2.3 TESTES DE AVALIAÇÃO DO SÊMEN

A avaliação *in vitro* da viabilidade espermática pós-descongelação é realizada através de uma série de exames que determinam a motilidade espermática e morfologia do acrossomo, concentração extracelular de enzimas e teste de termorresistência, e teste de turgidez em condições hipo-osmóticas, entre outros (MARTINS, 1997).

Para que o espermatozoide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas normais. A presença de membranas íntegras é pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação

espermática, penetração nos revestimentos do oócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema possam ocorrer (ARRUDA et al., 2009).

De acordo com Ceneghini (2005), há uma grande diversidade de biotécnicas que vem sendo desenvolvidas para análise seminal como, por exemplo, a avaliação computadorizada das características seminais, técnicas de sexagem espermática, testes hipo-osmóticos, avaliação de proteínas do plasma seminal, produção de espécies reativas de oxigênio. A motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica com uma gota de sêmen entre a lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. Uma outra maneira de avaliar o sêmen é através do uso de sondas fluorescentes na avaliação espermática, que busca avaliar a integridade e função de compartimentos específicos da célula espermática.

Quanto à avaliação das proteínas do plasma seminal, Killian et al. (1993) detectaram quatro delas associadas à fertilidade de touros, sendo duas proteínas (26 kDa e 55 kDa) predominantes em touros de alta fertilidade e duas proteínas (16 kDa cada) predominantes em touros de baixa fertilidade. Posteriormente, Cancel et al. (1997) identificaram a proteína de 55 kDa, mais prevalente no sêmen de touros de mais alta fertilidade, como sendo a osteopontina (OPN). Da mesma forma, Gerena et al. (1998) identificaram a proteína de 26 kDa como sendo a lipocalina tipo prostaglandina D sintetase (L-PGDS). Todavia, Roncolletta et al. (1999) encontraram alta incidência de uma proteína com aproximadamente 61,8 kDa em touros da raça Gir cujo sêmen foi considerado de alta congelabilidade, enquanto, Jobim et al. (2002) encontraram a presença das proteínas albumina (66 kDa) e OPN (55 kDa) em sêmen bovino de alta congelabilidade (ARRUDA et al., 2009).

Pouca quantidade de ácido docosaexaenóico (DHA) foi encontrado em espermatozoides humanos e em outros estudos notou-se que o DHA era poli-insaturado e o ácido palmítico era saturado. A alta concentração de DHA nas ejaculações de espermatozoides vinha sendo proposto a ser uma associação positiva com a motilidade espermática em humanos (AKSOY et al., 2006).

Para a avaliação da fertilidade potencial de partidas de sêmen congelado de bovino foi proposto em 1967 por Dimitropoulos, o teste de termo de resistência (TTR). O teste consiste na incubação de uma amostra de sêmen descongelado, em banho-maria, em temperatura e tempo pré-determinados, de acordo com a espécie animal. A motilidade progressiva e o vigor espermático são as características seminais analisadas durante a execução do teste. O sêmen bovino é considerado de boa qualidade se a amostra submetida ao TTR apresentar ao final do teste pelo menos 15% de motilidade espermática progressiva retilínea e 3 de vigor espermático (SIQUEIRA, 2004).

Todavia, os testes tradicionais de avaliação do sêmen ainda não apresentam correlação satisfatória com a fertilidade do sêmen bovino quando empregado na fertilização *in vitro*, obrigando a realização de testes funcionais do sêmen antes de seu emprego amplo nas rotinas de FIV. Assim, o desenvolvimento de testes rápidos e confiáveis que consigam prever a fertilidade do sêmen antes da FIV terá grande impacto positivo no campo da fertilização *in vitro*.

A criopreservação do sêmen é uma das principais biotecnologias aplicadas à reprodução, permitindo que o sêmen seja transportado, armazenado e utilizado sempre que necessário. No entanto, sabe-se que esta técnica provoca inúmeras lesões à célula espermática. Um dos principais fatores que levam aos danos causados pela criopreservação é o estresse oxidativo. O estresse oxidativo é causado pela ação das espécies reativas de oxigênio que podem provocar danos estruturais a biomoléculas, DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, assim como a outros componentes celulares. Entre os danos mais significativos causados pelas espécies reativas de oxigênio estão os produzidos ao material genético do espermatozoide. Isto ocorre, pois mesmo uma célula com DNA lesado pode vir a fertilizar um oócito. Este por sua vez possui mecanismos de reparos. Estes danos podem não ser reparados completamente resultando em mutações neste DNA. Caso isso ocorra, alguns eventos podem acontecer: falha na fertilização, baixas taxas de implantação, morte embrionária precoce, aborto ou doenças genéticas na prole, incluindo câncer. Mesmo que nenhum destes eventos ocorra, ainda assim,

possíveis informações genéticas errôneas podem ser transmitidas e só serem expressas após varias gerações (SOBRINHO, 2009).

O estresse oxidativo é um fator associado à diminuição da fertilidade durante a estocagem do sêmen. A geração de espécies reativas ao oxigênio é consequência normal do metabolismo oxidativo e parece estar envolvida nos danos dos espermatozoides em condições hipotérmicas de estocagem. O excesso de reação oxidativa tem efeito destrutivo na membrana espermática e no DNA dos espermatozoides. A membrana espermática é rica em ácidos graxos poliinsaturados (Zalata & Depuydt, 1998), os quais se tornam altamente sensíveis a espécies reativas de oxigênio (CASTILHO et al, 2009).

2.4 A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite a identificação de compostos desconhecidos, elucidação estrutural, verificação das propriedades químicas de moléculas e quantificação de compostos conhecidos. O espectrômetro de massas pode também fornecer a “impressão digital” das espécies moleculares presentes em uma mistura complexa para caracterização do mesmo ou para comparação em banco de dados, confirmando a sua identidade (FERREIRA et al., 2008).

A informação obtida em espectros de MS permite recolher informação sobre a massa molecular dos compostos em estudo, e a análise da sua fragmentação em espectros de MS/MS fornece informação detalhada sobre a estrutura dos compostos. Esta técnica é cada vez mais utilizada, nos dias de hoje, na análise de produtos naturais, incluindo alimentos. Na análise, a espectrometria de massa é aplicada com o objetivo de caracterização dos seus constituintes principais, nomeadamente a sua constituição em proteínas, lipídeos, polissacarídeos e outros.

Para análise por MS, as amostras podem ser inseridas diretamente no espectrômetro de massas, ou o equipamento pode ser acoplado a uma técnica de separação, como a cromatografia gasosa (GC), a cromatografia líquida (LC) ou a eletroforese capilar. A possibilidade de automação aliada à rapidez das análises permite que grande número de amostras seja analisado em curto período de tempo (segundos ou minutos para cada amostra). Resumidamente, a análise por MS consiste na geração de íons com base em compostos (orgânicos ou inorgânicos) por meio de um método de ionização apropriado. Em seguida, os íons são separados por meio de sua relação massa-carga (*m/z*) em um analisador de massas e detectados qualitativamente e ou quantitativamente por meio de um detector, o qual "conta" os íons. A magnitude do sinal elétrico em função da razão *m/z* é convertida por um processador de dados, o qual gera o espectro de massas correspondente (FERREIRA et al., 2009).

2.5 ANÁLISE DE SÊMEN UTILIZANDO A ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O sucesso na fertilização depende tanto da integridade da membrana espermática quanto da sua adequada composição de fosfolipídios (FLESH; GADELLA, 2000). Alguns estudos utilizando espectrometria de massas descreveram características lipídicas do sêmen de suínos, humanos (LEISSIG et al., 2004) e bovinos (SCHILLER et al., 2003). Em bovinos, a análise dos fosfolipídeos de membrana revelou que a fosfatidilcolina (FC) corresponde à maior quantidade de fosfolipídeos, com menor proporção de esfingomielina (SM) e fosfatidiletanolamina (FE). Também demonstraram que quantidade significativa de FC e FE são formadas por ligações do tipo éter, alquil e alquenil e apenas pequena parcela consiste de ligações do tipo diacil.

Os espermatozoides possuem uma composição lipídica muito característica, com significativa quantidade de ácidos graxos altamente insaturados, como o ácido docosahexaenoico (22:6; ZALATA et al., 1998) ou ácido docosapentanoico (22:5) e

araquidônico (20:5), que são responsáveis por manter a fluidez da membrana e sua capacidade de fertilização (MÜLLER et al, 1999). Entretanto, frações dos resíduos altamente insaturados dos ácidos graxos variam grandemente de individuo para indivíduos e podem responder pelas diferenças observadas na capacidade fecundante e criotolerância do sêmen (PARKS; LYNCH, 1992). Outra característica marcante dos fosfolipídeos de membrana dos espermatozoides é a presença de plasmalógenos (PARKS; LYNCH, 1992). Plasmalógenos são fosfolipídios com ligação do tipo éter e possuem um alquil-éter no posição *sn-1* do glicerol (FUCHS et al., 2007).

A espectrometria de massas provou ser uma técnica extremamente eficiente e sensível para a determinação da composição dos lipídeos de membrana no sêmen, todavia os relatos existentes na literatura limitam-se a descrever a composição do sêmen, não existindo trabalhos que buscaram estabelecer correlações funcionais entre a composição lipídica e capacidade de fertilização ou criotolerância.

2.6 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: a dos com atividade enzimática e a dos sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (MOREIRA et al., 2004).

Os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. O efeito cooperativo entre as vitaminas C e E é frequentemente mencionado na literatura, mostrando que

a interação dessas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção do DNA (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

A importância concernente ao desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos, e doses ideais para obter proteção. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas, ou tecidos. A vitamina C, por exemplo, atua na fase aquosa como um excelente antioxidante sobre os radicais livres, mas não é capaz de agir nos compartimentos lipofílicos para inibir a peroxidação dos lipídeos. Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que essa vitamina na presença de metais de transição, tais como o ferro, pode atuar como uma molécula pró-oxidante e gerar os radicais H_2O_2 e $OH^{\cdot}$. Geralmente, esses metais estão disponíveis em quantidades muito limitadas e as propriedades antioxidantes dessa vitamina predominam *in vivo* (BIANCHI ANTUNES, 1999).

2.7 FOSFOLIPÍDIOS

Os fosfolipídios são componentes essenciais de todas as membranas biológicas (JÄGER et al., 2007).

2.7.1 Fosfatidilcolina (FC)

A fosfatidilcolina é geralmente a mais abundante dos fosfolipídios e está presente nas bicamadas das membranas de animais e plantas. Atua também como o principal fosfolipídeo circulante no plasma, onde é um componente integral das lipoproteínas. Por outro lado, é menos frequentemente encontrado nas membranas bacterianas com a faixa de pH fortemente ácido e fortemente alcalino. Em tecidos

animais, algumas das suas funções da membrana parecem ser compartilhadas com o esfingolipidio e com a esfingomielina (CRISTHIE, 2010).

Para Mertins (2008), a fosfatidilcolina (FC) consiste de uma mistura de fosfolipídeos naturais constituídos por uma extremidade polar formada por um grupo colina e um grupo fosfato ligado à porção hidrofóbica. Devido à estrutura polar-apolar, essas moléculas tendem a se auto-organizar em bicamadas As características de membranas utilizando FC vêm sendo estudadas no intuito de desenvolver novos sistemas para as mais diversas áreas, em especial nas ciências farmacêuticas e na biomedicina. Atualmente a FC é largamente empregada nas indústrias farmacêutica e cosmética como emulsificante, excipiente e na produção de lipossomas, bem como nas indústrias alimentícias e de tintas como estabilizante e emulsificante.

Fosfatidilcolina (PC) proporciona fluidez na membrana, distribuição de carga e de caráter eletrônico, que as enzimas e outras moléculas da membrana necessitam para realizar suas funções. A fosfatidilcolina também atua no fígado, pulmões, trato gastrointestinal e os rins como uma superfície ativa para revestimentos de células e suplementação com fosfatidilcolina, isso ajuda a controlar os níveis saudáveis de colesterol (JÄGER et al., 2007).

2.7.2 Esfingomielina (SM)

Esfingomielina (ou fosforilcolina ceramida) consiste de uma unidade de ceramida com uma fração de fosforilcolina. É um componente ubíquo presente nas membranas celulares de animais, onde é o esfingolipídio mais abundante. Pode compreender até 50% dos lipídeos em certos tecidos, embora a concentração de fosfatidilcolina seja geralmente mais baixa. Pode ser encontrado no cérebro na quantidade de 10%, além de ser o mais abundante dos lipídios nas hemácias da maioria dos ruminantes, onde ele substitui totalmente a fosfatidilcolina. Neste exemplo, é conhecido por ativar a fosfolipase A que divide o glicerofosfolípidos, mas

não a esfingomielina. Atualmente, apesar de terem sido identificados erroneamente na literatura, as exceções são os esfingomielinas dos testículos e espermatozoides, que contêm cadeias muito longas de ácidos graxos poliinsaturados (até 34 átomos de carbono). A natureza das moléculas de esfingomielinas produzidos diferem consideravelmente dos precursores de ceramidas, oferecendo especificidade de substrato considerável para as sínteses de esfingomielina. Hoje é reconhecido que a esfingomielina e o colesterol têm uma grande afinidade entre eles e são geralmente localizados juntos em determinadas regiões das membranas e na superfície das partículas de lipoproteína. Por outro lado, as evidências mostram que a esfingomielina e o metabolismo do colesterol estão estreitamente integradas, em especial, que esfingomielina pode controlar a distribuição do colesterol nas células. Além de sua função nas membranas, a esfingomielina atua juntamente com mensageiros intracelulares e outros componentes que têm funções essenciais na membrana. A esfingomielina é facilmente isolado a partir de tecidos animais através de cromatografia de absorção (TLC e HPLC), embora os picos pode se dividir em duas ou três frações. Isto é devido às mudanças na hidrofobicidade resultante da ampla gama de comprimentos das cadeia constituintes dos ácidos graxos Hoje em dia utiliza-se a espectrometria aplicando vários métodos (ionização por electrospray, principalmente) para a análise de esfingomielina e outros esfingo-fosfolipídeos (CRISTHIE, 2010).

2.7.3 Fosfatidiletanolamina (PE)

Fosfatidiletanolamina é normalmente o segundo fosfolipídio mais ibundante em vegetais e animais e é frequentemente o componente lipídico principal nas membranas microbianas. Fosfatidiletanolamina também pode ser formado pela reação enzimática de etanolamina com fosfatidilserina, ou por re-acilação de lisofosfatidiletanolamina, tal como acontece com outros fosfolípideos, onde a composição de ácidos graxos final nos tecidos animais é atingido por um processo

de remodelação conhecida como o ciclo Lands'. O primeiro passo é a hidrólise de uma fosfolipase A2 para lisofosfatidilglicerol, seguido por re-acilação por meio de vários acil-CoA. Embora fosfatidiletanolamina algumas vezes é comparado com fosfatidilcolina em sistemas biológicas, há diferenças significativas nas áreas de química e nas propriedades físicas destes lipídios. Em tecidos animais, fosfatidiletanolamina é especialmente importante nas membranas do sarcolema do coração durante a isquemia, e ela está envolvida na secreção de lipoproteínas de fígado, tem funções de fusão e cisão de membrana, e é um precursor biossintético na anandamida (CHRISTIE, 2010).

2.7.4 Fosfatidilglicerol (PG)

Fosfatidilglicerol é um lipídio onipresente que pode ser o componente principal de membranas de algumas bactérias e ele também é encontrado nas membranas celulares das plantas e animais, onde ele aparece para realizar funções específicas. A carga do grupo fosfato significa que é um perfil lipídico aniônico e possui pH neutro. Fosfatidilglicerol é encontrado em quase todos os tipos de bactérias, por exemplo, Escherichia coli tem até 20% de fosfatidilglicerol em suas membranas. O fosfatidilglicerol é sintetizado apenas nas mitocôndrias dos eucariontes não fotossintéticos, e é usado como precursor para a cardiolipina, que está localizado na membrana mitocondrial interna e é necessária para o bom funcionamento das enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa. Em cianobactérias, além de seu papel na fotossíntese, o fosfatidilglicerol está envolvido nos processos de cisão e divisão celular para formar estruturas na bicamada, auxiliado por sua capacidade de se ligar a proteínas específicas (CRISTHIE, 2010).

2.7.5 Ácido Fosfatídico (PA)

Ácido fosfatídico não é um componente lipídico abundante de qualquer organismo vivo, mas é extremamente importante como um intermediário na biossíntese de triacilgliceróis e fosfolipídios e como uma molécula sinalizadora. É frequentemente encontrado em tecidos ou pode surgir por hidrólise enzimática inadvertida durante condições impróprias de armazenamento ou durante a análise de extração. Possui uma molécula ácida e carrega uma carga negativa. Em tecidos animais e vegetais envolve a acilação sequencial de α-glicerofosfato, derivado do catabolismo da glicose, por derivados de acil-coA de ácidos graxos. No entanto, o ácido fosfatídico foi implicado em muitos aspectos da bioquímica e fisiologia de células animais, incluindo a proliferação celular e diferenciação, transformação celular, progressão do tumor e sinalização de sobrevivência. Há algumas evidências que eles podem participar da regulamentação de alguns eventos de tráfico de membrana, e está envolvida na ativação da enzima NADPH oxidase, que atua como parte do mecanismo de defesa contra infecção e dano tecidual durante a inflamação. Ele pode ter um papel na promoção da atividade da fosfolipase A2, e parece função na formação de vesículas e de transporte dentro da célula ao ligar-se à proteínas específicas, incluindo proteínas quinases, fosfatases e proteínas G que podem aumentar ou inibir suas atividades (CRISTHIE, 2010).

2.7.6 Lisofosfatidilcolina (LPC)

O lisofosfatidilcolina é encontrado em pequenas quantidades na maioria dos tecidos. No plasma de espécies animais, o lisofosfatidilcolina são formados por um sistema de enzimas específicas de lecitina e colesterol ciltransferase (LCAT), que é secretada pelo fígado. A enzima catalisa a transferência de ácidos graxos a partir da posição *sn*-2 da fosfatidilcolina de colesterol livre no plasma, ocorrendo a formação de ésteres e colesterol. Lisofosfatidilcolina também pode ter propriedades pró-

inflamatórias in vitro e é conhecido por ser um componente patológico de lipoproteínas oxidadas (LDL) no plasma e de lesões ateroscleróticas. Recentemente, foram identificados algumas funções na sinalização celular, e receptores específicos (acoplados às proteínas G), onde ela ativa a fosfolipase C que libera diacilglicerol e inositol trifosfato, aumentando a quantidade intracelular de Ca^{2+} e promove ativação da proteína quinase C. O lisofosfatidilcolina pode ser formado por acaso durante a extração de lipídios de tecidos (CHRISTIE, 2010).

2.7.7 Lisofosfatidiletanolamina (LPE)

Lisofosfatidiletanolamina é encontrada em pequenas quantidades em tecidos. É formado por hidrólise de fosfatidiletanolamina pela enzima fosfolipase A2, como parte de um ciclo de-acilação/re-acilação que controla a composição molecular das espécies. Nas plantas, lisofosfatidiletanolamina é um inibidor específico de fosfolipase D, uma enzima-chave na degradação dos fosfolipídios da membrana durante o início estágios de senescência das plantas, que retarda a senescência das folhas, flores e frutos pós-colheita. Ele é usado comercialmente em um spray para estimular amadurecimento de frutos e senescência em atraso. Em bactérias, exibe propriedades que promovem a dobradura funcional da síntase de citrato e outras enzimas. Algumas propriedades biológica têm sido relatadas em tecidos de animais in vitro, mas um receptor específico ainda não foi identificado (CHRISTIE, 2010).

2.7.8 Ácido Lisofosfatídico (LPA)

Ácido Lisofosfatídico é o mais simples glicerofosfolipidio encontrado em diferentes tecidos de espécies moleculares com ácidos graxos saturados e

insaturados. É muito importante biologicamente, influenciando muitos processos bioquímicos, além de agir como o precursor biossintético do ácido fosfatídico. Em particular, o ácido lisofosfatídico é um mediador lipídico intercelular com as atividades semelhante ao fator de crescimento, e é rapidamente produzido e lançado a partir de plaquetas para influenciar células-alvo. O ácido lisofosfatídico promove eventos pró-inflamatórias que levam ao desenvolvimento do ateroma, e incentiva a progressão da doença (CHRISTIE, 2010).

2.7.9 Fosfatidilinositol (PI)

Fosfatidilinositol é um lipídio importante, tanto como um componente da membrana como um participante de processos metabólicos essenciais em todas as plantas e animais. É constituido de um ácido fosfatídico ligado ao grupo fosfato inositol (hexahidroxiciclohexano). O fosfatidilinositol é especialmente abundante no tecido cerebral, onde ele pode chegar a 10% do fosfolipídios, mas também está presente em todos os tecidos e tipos celulares. O fosfatidilinositol é então encontrado nas membranas, quer por transporte vesicular ou através de proteínas de transferência. O mecanismo para a biossíntese de e fosfatidilglicerol às vezes é denominado por um ponto de ramificação na síntese de fosfolipídios, sendo que o fosfatidilcolina e o fosfatidiletanolamina são produzidos por uma rota um pouco diferente.
Além de atuar nas membranas carregadas negativamente, o fosfatidilinositol parecem ter papel crucial na ligação interfacial de proteínas e na regulação da proteínas na interface celular. Poucas bactérias parecem conter fosfatidilinositol, embora lipídios são encontrados nas actinobactérias. Como todos os fosfolipídeos, o fosfatidilinositol não é fácil de isolar em um estado puro, é necessário um cuidado especial para assegurar que ele está totalmente resolvido a partir de fosfatidilserina.

No entanto, isto pode ser realizada por absorção TLC ou HPLC (CHRISTIE, 2010).

2.7.10 Fosfatidilserina (PS)

Fosfatidilserina (PS) é um nutriente fosfolipídio natural que é mais concentrada em órgãos com alta atividade metabólica, como cérebro, fígado, coração pulmões e músculo esquelético. PS está localizada principalmente na camada interna da membrana celular e tem uma variedade de funções estruturais e regulatórias. PS modula a atividade dos receptores, canais iônicos, enzimas e moléculas de sinalização e está envolvido na membrana que regulam a fluidez. Tradicionalmente, os suplementos de PS foram obtidos a partir do córtex bovina (BC-PS), porém, devido ao potencial de transferência de doenças infecciosas os PS derivados da soja (S-PS) foi criado como uma alternativa segura. PS tem sido mostrado para melhorar uma variedade de funções cerebrais, que tendem a diminuir com a idade. Em estudos recentes, o PS tem sido mostrado para melhorar o humor em jovens durante o estresse mental. Durante os estágios iniciais de supertreinamento os músculos ficam doloridos, e ocorre um aumento da frequência cardíaca e queda dos níveis de testosterona. O corpo tem dificuldades de adaptação, mas geralmente se recupera com descanso de alguns dias. PS tem sido demonstrada para acelerar a recuperação, evitar a dor muscular, melhorar o bem-estar, e podem possuir propriedades ergogênicas na musculação de atletas envolvidos em ciclismo, e corridas de resistência. PS foi relatado para ser um complemento eficaz para o combate ao estresse induzido pelo exercício e prevenir a deterioração fisiológica que acompanha muito exercício. BC-PS foi relatado para atenuar o cortisol sérico e do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) a respostas aos exercícios de ciclismo. (STARKS et al, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar o perfil lipídico do sêmen bovino, utilizando a espectrometria de massas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar as diferentes classes de lipídeos encontradas no sêmen bovino através da espectrometria de massas;

Caracterizar o perfil lipídico do sêmen bovino, com especial ênfase aos fosfolipídeos de membrana;

Comparar o perfil lipídico de sêmen de touros tratados com antioxidantes com sêmen touros tratados sem antioxidantes (controle);

Comparar o perfil lipídico de sêmen bovino fresco por análise direta e por análise após a extração lipídica;

Detectar variações na composição lipídica através do uso da técnica de espectrometria de massas (MS).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DE SÊMEN, LAVAGEM DOS ESPERMATOZÓIDES E ARMAZENAMENTO

As coletas de sêmen foram realizadas por eletroejaculação em 9 touros da raça Nelore, mantidos em pastagem, com água e sal mineral *ad libitum* no campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo, no período de fevereiro a junho de 2010.

Após a coleta, as amostras de sêmen foram lavadas três vezes em solução de PBS livre de Ca^{2+} Mg^{2+} (10g de NaCl, 0,25g de KCl, 1,07g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25g de KH_2PO_4 e água ultrapura q.s.p. 1 L) e centrifugadas (3000xg, 2 minutos). A cada lavagem o sobrenadante foi descartado e após a última lavagem o pellet de espermatozoides foi ressuspendido em uma solução de 1:1 PBS livre de Ca^{2+} Mg^{2+}:metanol (grau HPLC) e armazenadas a -80°C até o momento das análises por espectrometria de massas.

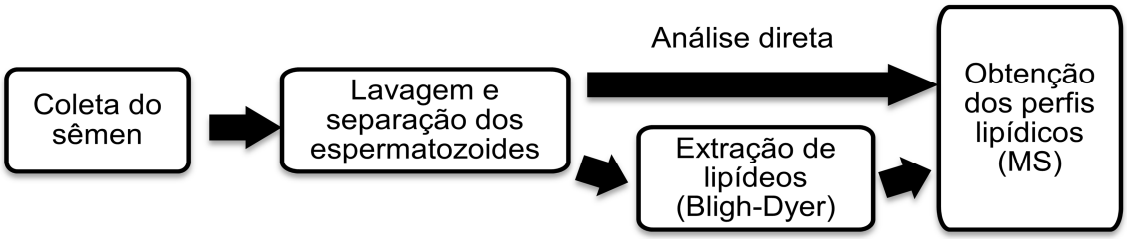
4.2 ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO DO SÊMEN ÍNTEGRO E DO EXTRATO LIPÍDICO DO SÊMEN

De modo a verificar se existem diferenças entre os perfis lipídicos gerados pela análise direta do sêmen (aquisição de espectro de massas dos espermatozoides íntegros após a lavagem) ou pela análise dos extratos lipídicos dos espermatozoides foram realizadas aquisições de espectros de massa de amostras

de espermatozoides de modo direto (sem extração lipídica) ou após a extração lipídica pela técnica de Bligh-Dyer.

Foram utilizadas para as análises amostras de 9 animais, em três repetições, pelo método direto ou após a extração lipídica, conforme o esquema abaixo (Figura 3).

Figura 3 - Esquema das etapas do trabalho desde a obtenção das amostras até a obtenção dos dados



4.3 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

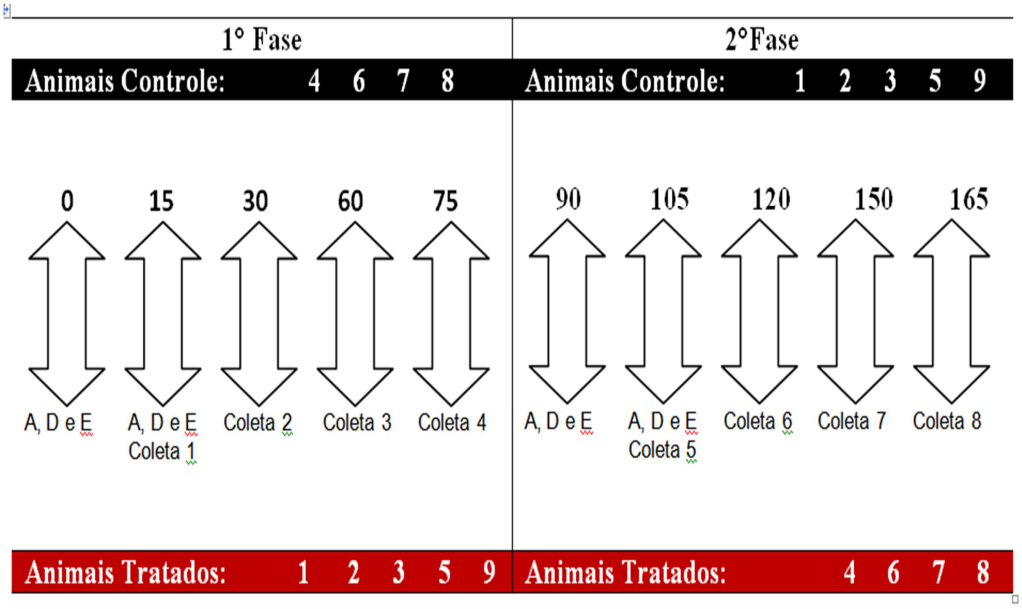
A extração de lipídios foi realizado utilizado o método de Bligh-Dyer (BLIGH; DYER, 1959). Resumidamente 0,5mL de sêmen foi transferido para um eppendorf de 1,5mL e os espermatozoides foram lavados três vezes em solução de PBS livre de Ca^{2+} Mg^{2+} (10g de NaCl, 0,25g de KCl, 1,07g de $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25g de KH_2PO_4 e água ultrapura q.s.p. 1 L) e centrifugadas (3000xg, 2 minutos). A cada lavagem o sobrenadante foi descartado e após a ultima lavagem o pellet de espermatozoides foi destinado à extração lipídica. Adicionou-se nos pellets 190µL de clorofórmio (grau HPLC) e 375µL de metanol (grau HPLC). As amostras foram homogeneizadas com a utilização do vortex de modo a gerar uma única fase. Em seguida acrescentou-se 187,5µL clorofórmio (grau HPLC) e 150µL de água ultrapura às amostras e as mesmas foram centrifugadas (3 minutos, 3000 rpm) formando duas fases. A fase superior foi descartada e a fase inferior (clorofórmio contendo os

lipídeos) foi transferida para novo microtubo. A fase lipídica foi então colocada em um concentrador a vácuo para secagem. Uma vez secas, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da análise, quando foram ressuspensas em metanol e clorofórmio.

4.4 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES NA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO SÊMEN

Para análise de efeitos da administração de antioxidantes sobre as características lipídicas seminais, 9 touros Nelore previamente expostos às mesmas condições ambientais foram separados em dois grupos. Na primeira fase 4 animais constituíram o grupo controle e 5 animais constituíram o grupo tratado. O grupo tratado recebeu duas doses uma combinação de vitaminas A, D e E injetável nos dias 0 e 15. As coletas de sêmen, nos dois grupos, foram realizadas nos dias 15, 30, 60 e 75. Na segunda fase os animais que faziam parte do grupo controle passaram a compor o grupo tratado e vice-versa. Os animais do grupo tratado receberam duas doses injetáveis de complexo A, D e E nos dias 90 e 105. As coletas de sêmen ocorreram nos dias 105, 120, 150 e 165. falta citar a figura 4 no texto.

Figura 4 - Animais selecionados para o grupo controle (parte superior) e para o grupo tratado (parte inferior) na 1° e na 2° fase das coletas. Os dias, indicados na parte superior de cada seta, mostram os tratamentos com as vitaminas A, D e E e o dia de cada coletas dos sêmens, parte inferior das setas



4.5 OBTENÇÃO DOS PERFIS LIPÍDICOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ANÁLISE DOS DADOS

Os espectros de massa das amostras de sêmen foram obtidos por modo positivo de aquisição, utilizando como matriz o ácido 2,5-dihidroxibenzóico (DHB; 150mg/Ml em metanol). Foi utilizado um MALDI-Q-TOF Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK), em modo *reflectron* e faixa de *m/z* 700-1000. Os espectros foram processados utilizando o software MassLynx 4.0 (Waters, Manchester, UK). Após suavização, desotopisação e normalização, os íons mais intensos em cada modo foram selecionados e considerados para atribuição dos lipídeos correspondentes. Após atribuição, as amostras com seus valores correspondentes de *m/z* foram submetidas à análise de componentes principais (PCA) utilizando o software MetaboAnalyst 2.0 (http://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/faces/Home.jsp), identificando lipídeos diferencialmente presentes entre as amostras submetidas ou não à extração lipídica, bem como aqueles diferencialmente presentes entre animais que receberam ou não os antioxidantes.

4.6 ANÁLISES UTILIZANDO OS MÉTODOS FORNECIDOS PELO METABOANALYST

Para obter uma análise analítica com maior rendimento metabolômico, uitilizou-se os métodos oferecidos pelo MetaboAnlyst 2.0. que tem como objetivo oferecer uma variedade de procedimentos comumente utilizado para processamento de dados metabolômica, normalização, análise estatística multivariada, bem como anotação de dados. A implementação atual centra-se na descoberta de biomarcadores e de classificação para binário ou multi-grupo de análise de dados.

Os métodos utilizados para as análises foram:

- PCA (Principal Component Analysis) - É um método supervisionado que utiliza técnicas de regressão multivariada para extrair através de combinação linear das variáveis originais (X) as informações que podem predizer a composição de classe (Y).
- VIP (Variable Importance in Projection) - é uma média ponderada da soma dos quadrados das cargas PLS (Partial-Least Squares). Os pesos são baseados na quantidade de variância explicada em cada dimensão Y. A medida da importância é baseada na soma ponderada de regressão dos coeficientes PLS. Os pesos são uma função da redução das somas de quadrados através do número de Componentes PLS.
- Teste-T – É um teste estatístico que permite a análise exploratória de dados. Os resultados são representados por um gráfico.
- Volcano Plot – Permite ver o resultado da análise em cada dimensão. Cada análise pode ser ajustada individualmente. Quanto mais longe a sua posição de (0, 0), o mais significativo o recurso correspondente. Nota-se que ambos os eixos x e y estão em escala logarítmica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL LIPÍDICO DE AMOSTRAS SUBMETIDAS OU NÃO À EXTRAÇÃO LIPÍDICA

A fim de investigar se ocorre interferência no perfil lipídico do sêmen obtido por MS a partir de amostras de espermatozoides analisadas diretamente (sem extração) em comparação com amostras de espermatozoides submetidas à extração lipídica pelo método Bligh-Dyer, amostras de sêmen foram submetidas ou não à extração lipídica, os espectros foram coletados (Figura 7) e os resultados analisados. A análise de componentes principais (PCA) revelou que as amostras dos grupos análise direta ou extração lipídica separam-se claramente no gráfico do PCA (Figura 5), com 61,5% da variação dos dados correspondente ao componente principal 1 e 17,8% da variação ao componente 2.

De modo a identificar e classificar os principais íons responsáveis pela diferenciação entre os grupos analisados foram realizadas nas três repetições dos experimentos a identificação dos íons diferenciais pelo método VIP (Figura 6), que é um método onde as principais variáveis são representadas por figuras, classificando em ordem decrescente dos íons mais diferenciais

Os principais íons diferencialmente presentes e responsáveis pela diferenciação entre os grupos estão representados na figura 7.

Figura 5 - PCA demonstrando as separações através do perfil lipídico das amostras de sêmen após análise direta (vermelho) ou após a extração lipídica (verde)

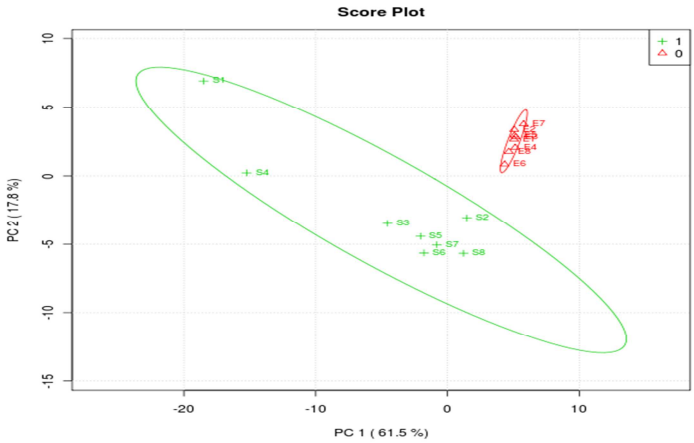


Figura 6 - Pontuação VIP identificando os principais íons diferenciais entre os perfis lipídicos das amostras de sêmen obtidas por análise direta ou por extração lipídica

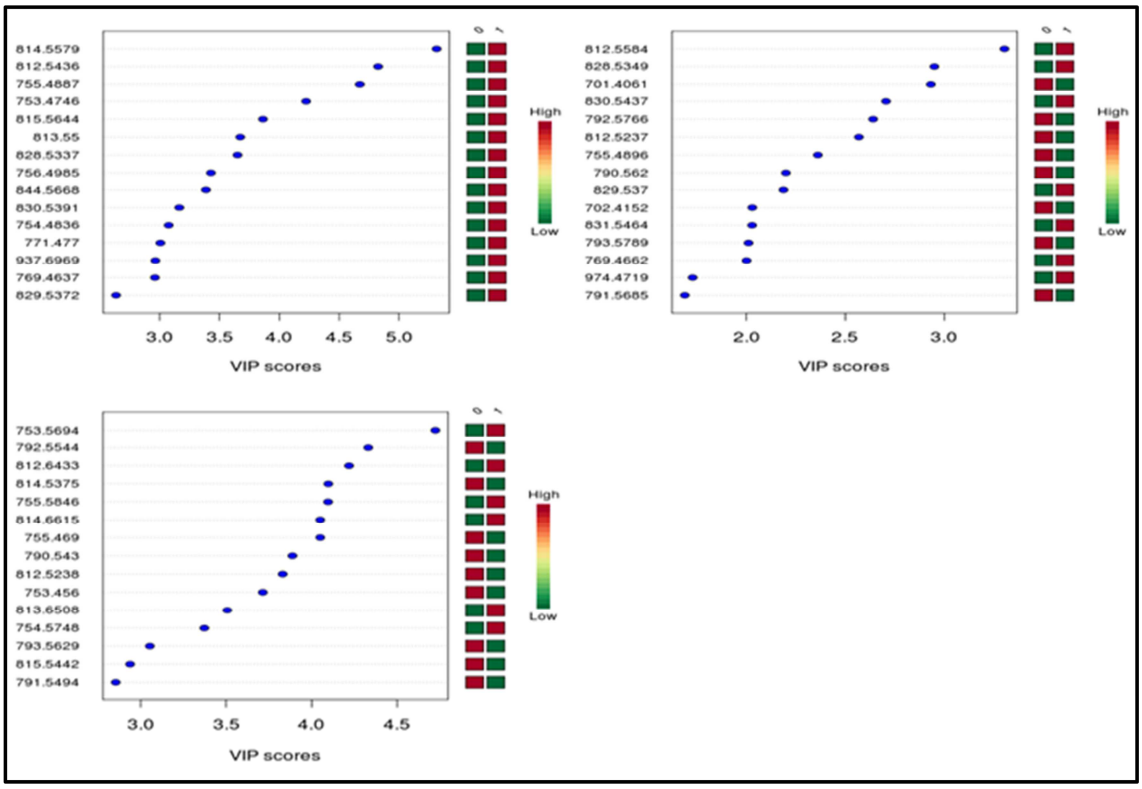
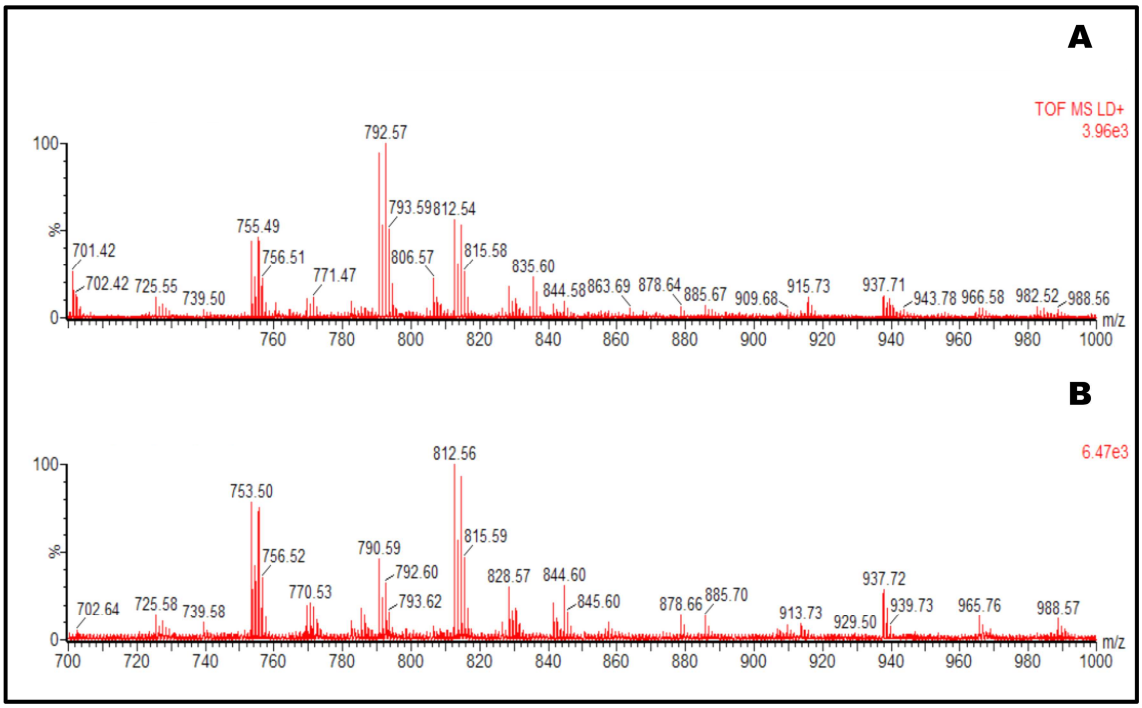


Figura 7 - O espectro A representa o perfil lipídico da análise após a extração lipídica, e o espectro B mostra o perfil lipídico da análise direta pelo método de Bligh e Dyer



De acordo com os principais íons identificados pelo método VIP e observando os espectros, é possível afirmar que os íons 701,4 e 792,5 aparecem mais intensos no perfil lipídico gerado após a extração lipídica, enquanto que os íons 753,5; 790,5; 812,5 e 814,5 aparecem com maior intensidade no perfil lipídico gerado através da análise direta.

No perfil lipídico da análise após a extração lipídica, o íon 701, segundo Milne et. al. (2006) pode ser classificado como esfingomielina. A esfingomielina têm uma grande afinidade com o colesterol e são geralmente localizadas juntos em determinadas regiões das membranas e na superfície das partículas de lipoproteína, além da possibilidade de seus picos se dividirem em duas ou três frações. Isto é devido às mudanças na hidrofobicidade resultante da ampla gama de comprimentos das cadeia constituintes dos ácidos graxos (CRISTHIE, 2010). O íon 792, também identificado no perfil lipídico da análise após a extração lipídica, é classificado como fosfatidiletanolamina como descrito por Milne et al. (2006).

Quando observado o perfil lipídico das amostras realizadas pelo método direto, os íons 790, 812 e 814 são classificados por fosfatidilcolina, e o íon 753 é classificado como esfingomielina, que, como descrito acima, têm uma grande afinidade com o colesterol e são geralmente localizadas juntos em determinadas regiões das membranas (MILNE et al., 2006)

A partir dessas análises podemos afirmar que o método de análise direta além de ser um método mais simples e rápido, pode gerar um perfil lipídico tão significativo quanto o método de extração lipídica.

5.2 EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINAS A, D E E NO PERFIL LIPÍDICO DO SÊMEN

A fim de descobrir se a suplementação com vitaminas interfere com a composição lipídica do sêmen bovino foram analisados por espectrometria de massas amostras de sêmen de animais que receberam ou não suplementação de vitaminas. Na primeira fase, composta pelas 4 primeiras coletas, o grupo Controle foi composto pelos animais de número: 4; 8; 6; e 7 enquanto que o grupo tratado era composto pelos animais: 1; 2; 3; 5 e 9. Na segunda etapa, os grupos invertem, sendo o grupo tratado composto pelos animais de números 4; 8; 6; e 7 e o grupo controle pelos animais de números 1; 2; 3; 5 e 9.

A presença de diferenças entre os grupos analisados foi verificada através de análise de componentes principais (Figura 8) e os íons com maior diferença de intensidade entre as amostras foram buscados através de teste-t e de Volcano plot.

Para cada uma das coletas estão apresentados os resultados da análise de componentes principais e os íons responsáveis pela diferenciação entre os grupos representados através dos resultados do test-t (Figura 9) e o Volcano plot (Figura 10).

Figura 8 - PCAs demonstrando as separações através dos perfis lipídicos das amostras de sêmens de animais controle (vermelho) e tratados (verde). A- Primeira coleta; B- Segunda coleta; C- Terceira coleta, D- Quarta coleta; E- Quinta coleta; F-Sexta coleta; G- Sétima coleta e H- Oitava coleta

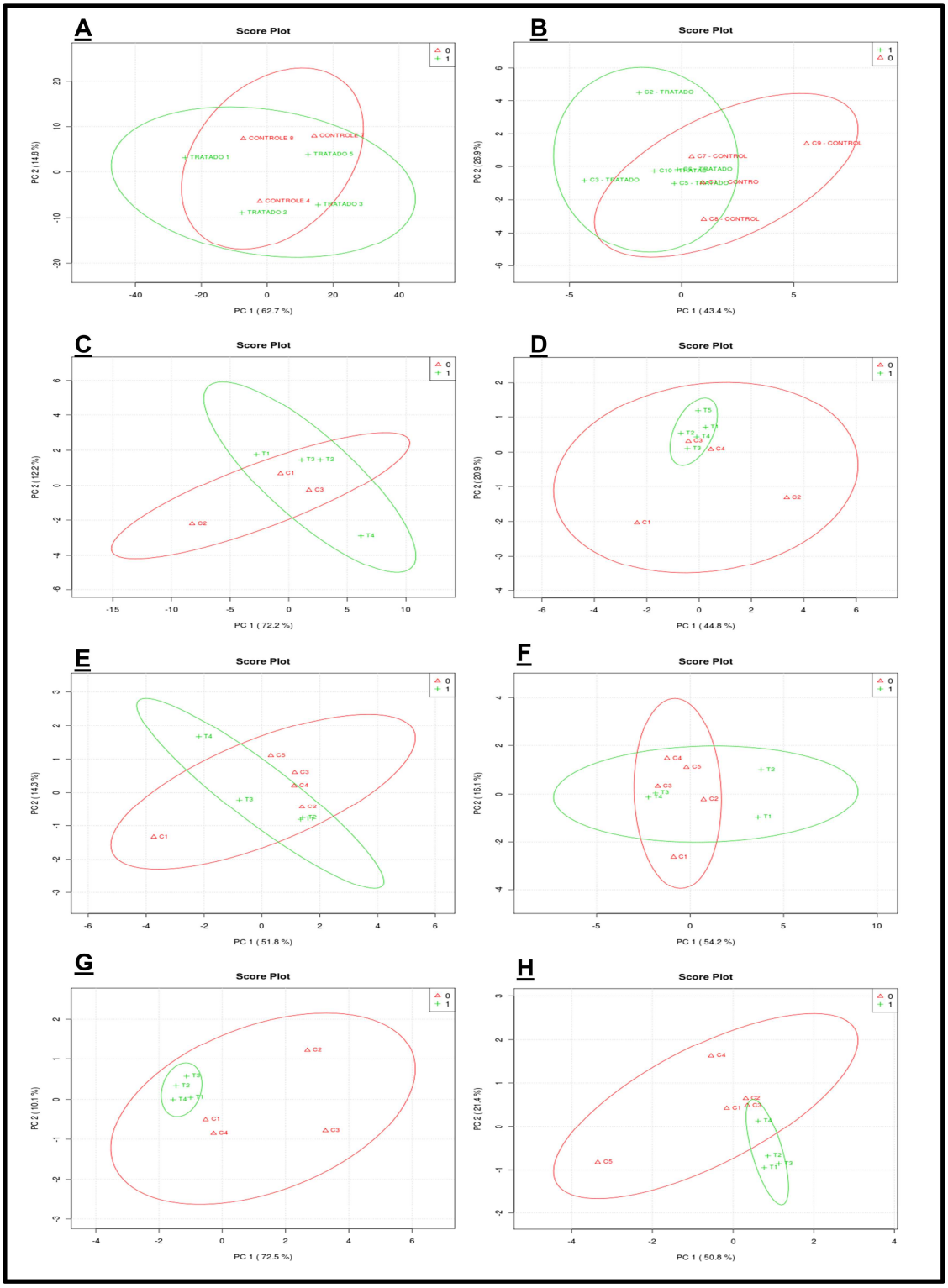


Figura 9 -A figura representa as características importantes selecionados pelo t-testes com nível de significância de 5%. Os círculos vermelhos representam íons acima do limiar. A- Primeira coleta; B- Segunda coleta; C- Terceira coleta, D- Quarta coleta; E- Quinta coleta; F- Sexta coleta; G- Sétima coleta e H- Oitava coleta

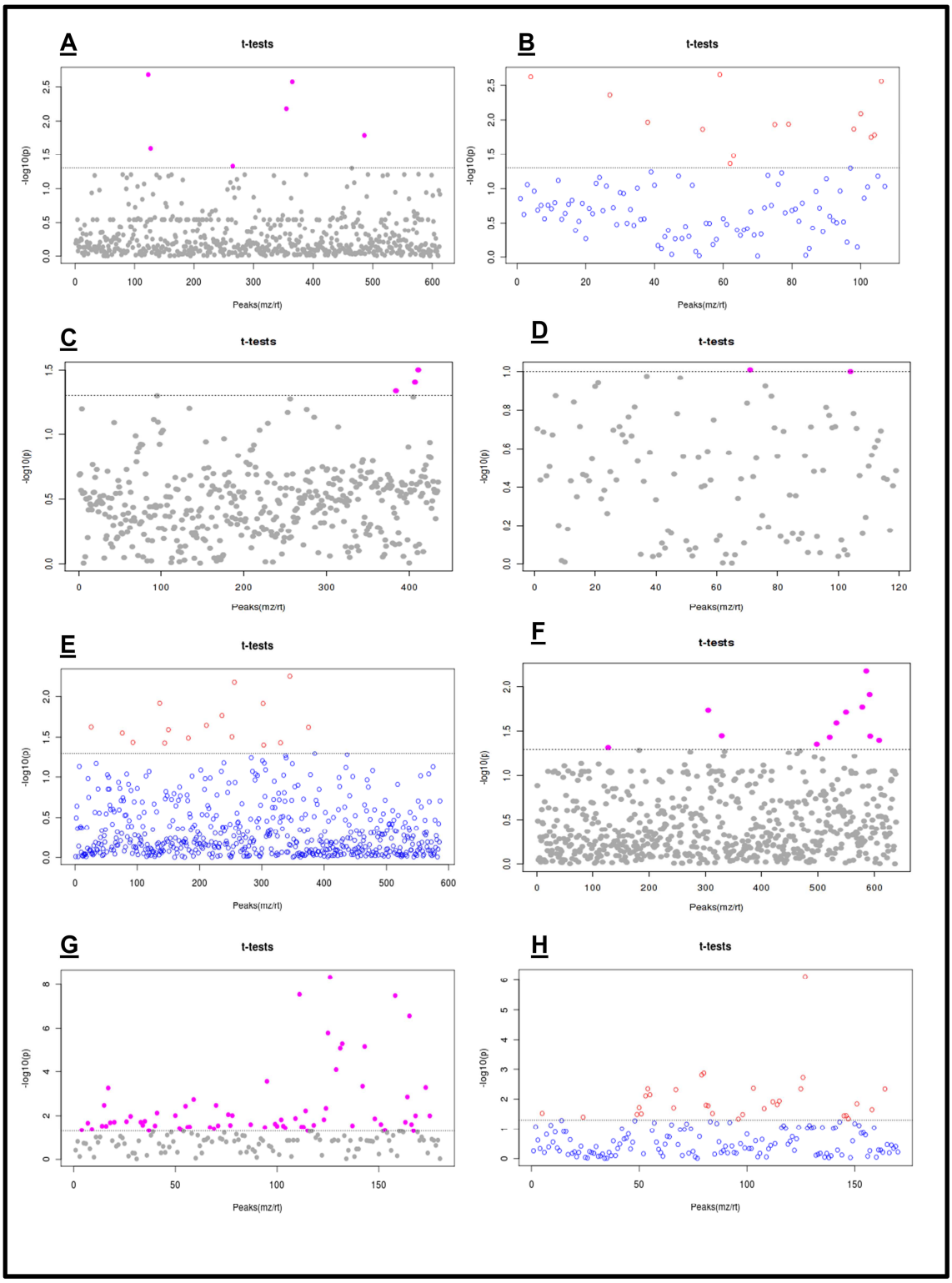
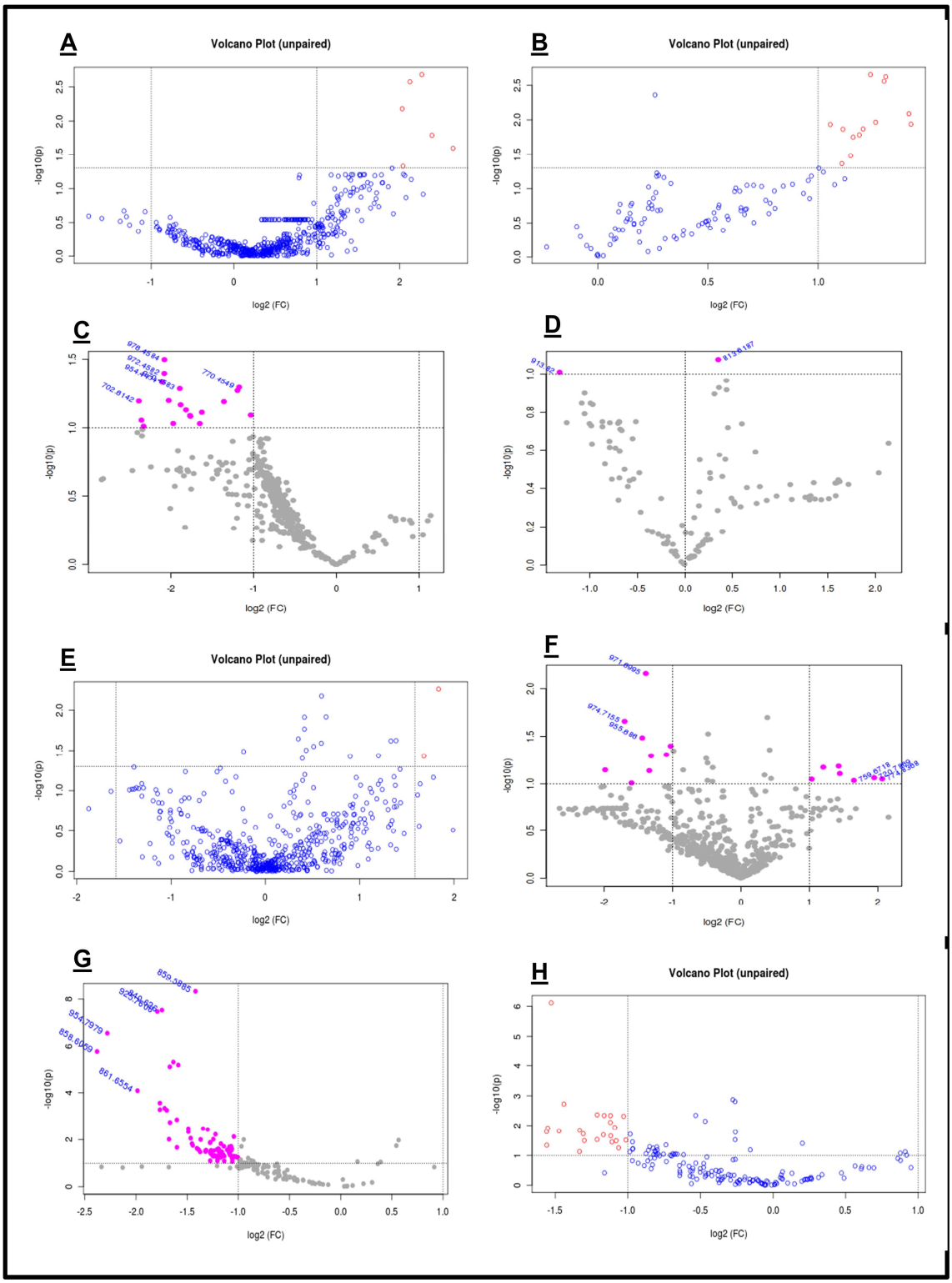
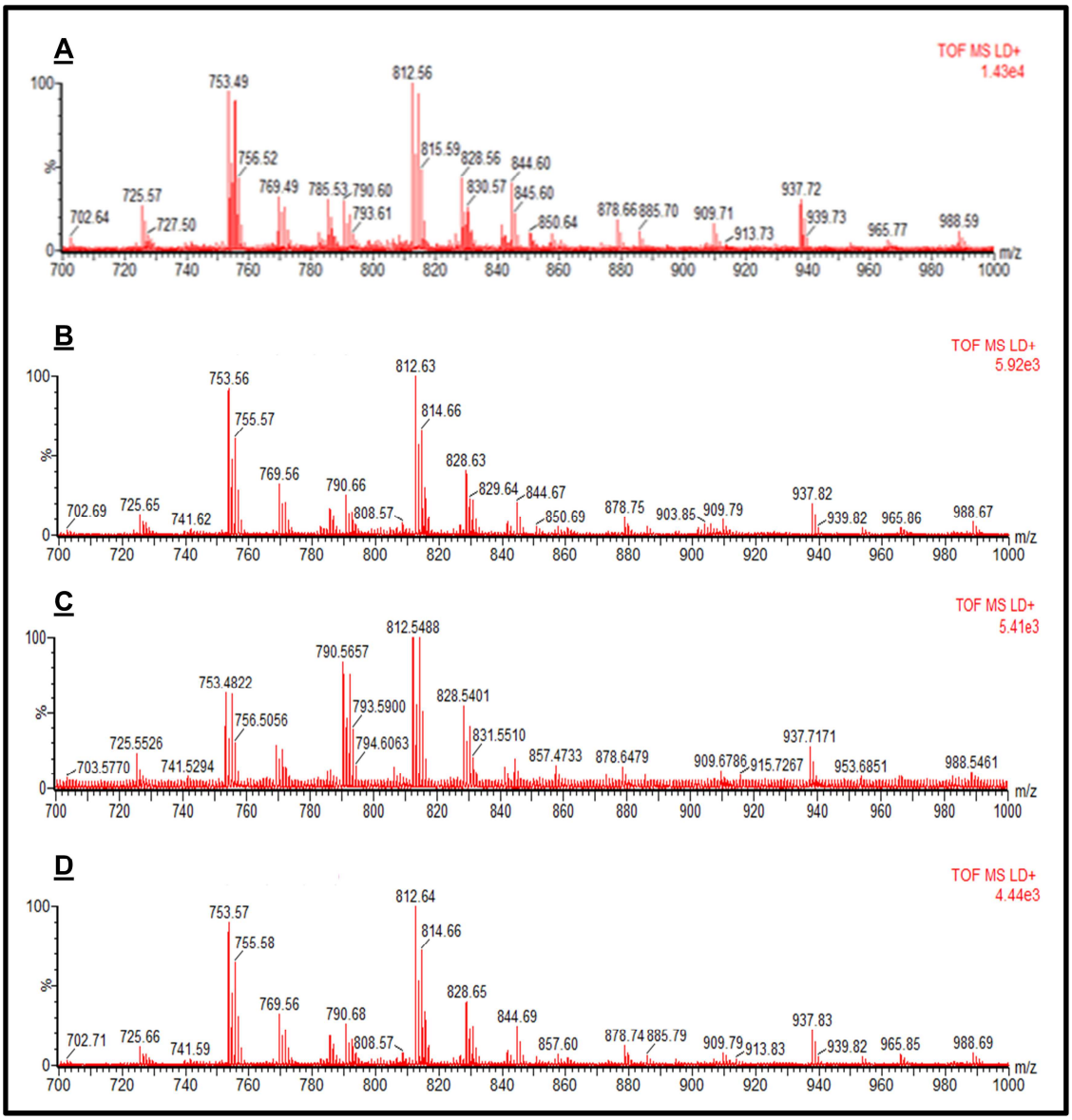


Figura 10 - Os círculos vermelhos representam íons acima do limiar. O fold change e os valores de p são transformados em log. As posições mais distantes do (0,0) são mais significantes. A- Primeira coleta; B- Segunda coleta; C- Terceira coleta, D- Quarta coleta; E- Quinta coleta; F-Sexta coleta; G- Sétima coleta e H- Oitava coleta



A figura 11 apresenta perfis lipídicos representativos dos animais expostos ou não à suplementação com vitaminas.

Figura 11 - Os espectros representam os principais perfis lipídicos dos sêmens de animais controles (A e B) e de animais tratados (C e D). A- Animal 7; B- Animal 9; C- Animal 7 e D- Animal 2



Os principais íons representativos encontrados pelos métodos test-t, Volcano Plot e os íons identificados nos espectros são descritos na quadro 1 abaixo.

Quadro 1 - Principais íons e suas devidas classificações identificados no perfil lipídico do sêmen com suplementação de vitaminas A, D e E pelos métodos utilizados e representados pelos espectros

m/z	***Classificação***
744.713	PE (18:018:2) + H+
753.52	SM (18:0) + Na+
767.41	PC (H+)
769.47	PC (16:0/22:6)
790.59	PC 36:0
792.5	PC (16:0/22:6)
812.56	PC (16:/22:6)
814.499	PC 38:2
828.6529	PC (16:0/22:6) + Na
830.4969	PC 16:0/22:5 + Na+
840.626	PC 40:3
858.6059	PC (18:0/22:5) + Na+
866.6748	PC 42:4
909.7041	PI (18:0/18:1)+ 2Na+

A partir da classificação acima, nota-se que o lipídio mais abundante durante as coletas foi a fosfotidilcolina. Em menor proporção é possível também identificar o fosfatidilinositol, representado pelo íon 909.7 e a esfingomielina, representado pelo íon 753.5. O fosfatidilinositol é um lipídio muito importante tanto como um componente da membrana como um participante de processos metabólicos e as esfingomielinas podem ser encontradas nos espermatozoides, que podem conter cadeias muito longas de ácidos graxos poliinsaturados (CHRISTIE, 2010).

O fosfatidiletanolamina, representado pelo íon 744.7 também é um lipídio muito importante formado pela reação enzimática de etanolamina com a

fosfatidilserina e está localizada principalmente na camada interna da membrana celular e tem uma variedade de funções estruturais e regulatórias, como por exemplo, modula a atividade dos receptores, canais iônicos, enzimas e moléculas de sinalização e está envolvido na membrana que regulam a fluidez (CHRISTIE, 2010).

Através destes resultados analisados é possível observar um perfil lipídico muito semelhante entre animais controles e tratados. Assim, a suplementação com vitaminas vitaminas A, D e E não gera alterações identificáveis nos perfis lipídicos dos espermatozoides.

5.3 ANÁLISE DO PERFIL LIPÍDICO POR ANIMAL DURANTE O PERÍODO DE COLETAS

A fim de descobrir se ocorrem alterações no perfil lipídico dos espermatozoides ao longo do tempo, amostras de espermatozoides de um mesmo animal foram avaliadas agrupando-as de acordo com o período, ou seja, quando o animal havia sido tratado com suplementação de vitaminas ou quando o animal pertencia ao grupo controle.

Para a classificação dos principais íons responsáveis pela diferenciação entre os grupos analisados foram realizadas análises utilizando o PCA (Figura 12), o método test-t (Figura 13) e o Volcano plot (Figura 14).

Os íons responsáveis pela diferenciação entre os grupos representados pelos métodos PCA, test-t, Volcano plot e os íons identificados nos espectros (Figura 14) estão listados conforme o quadro 2.

Figura 12 - PCAs demonstrando as separações através dos perfis lipídicos das amostras de sêmen de animais controle (vermelho) e tratados (verde). A- Animal 1; B- Animal 2; C- Animal 3, D- Animal 4; E- Animal 5; F- Animal 6; G- Animal 7; H- Animal 8 e I- Animal 9

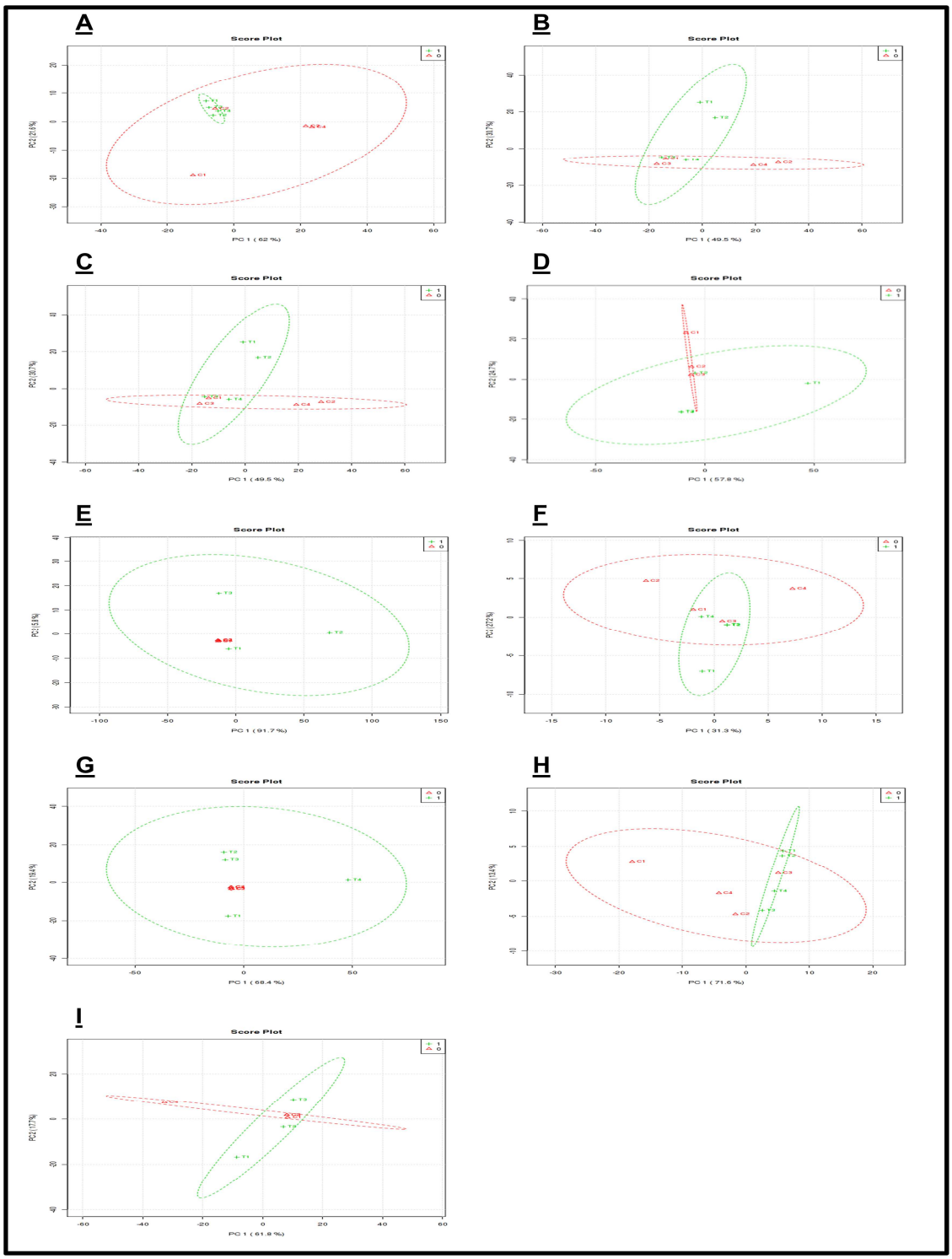


Figura 13 -A figura representa as características importantes selecionados pelo t-testes com nível de significância de 5%. Os círculos vermelhos representam íons acima do limiar. A- Animal 1; B- Animal 2; C- Animal 3, D- Animal 4; E- Animal 5; F- Animal 6; G- Animal 7; H- Animal 8 e I- Animal 9

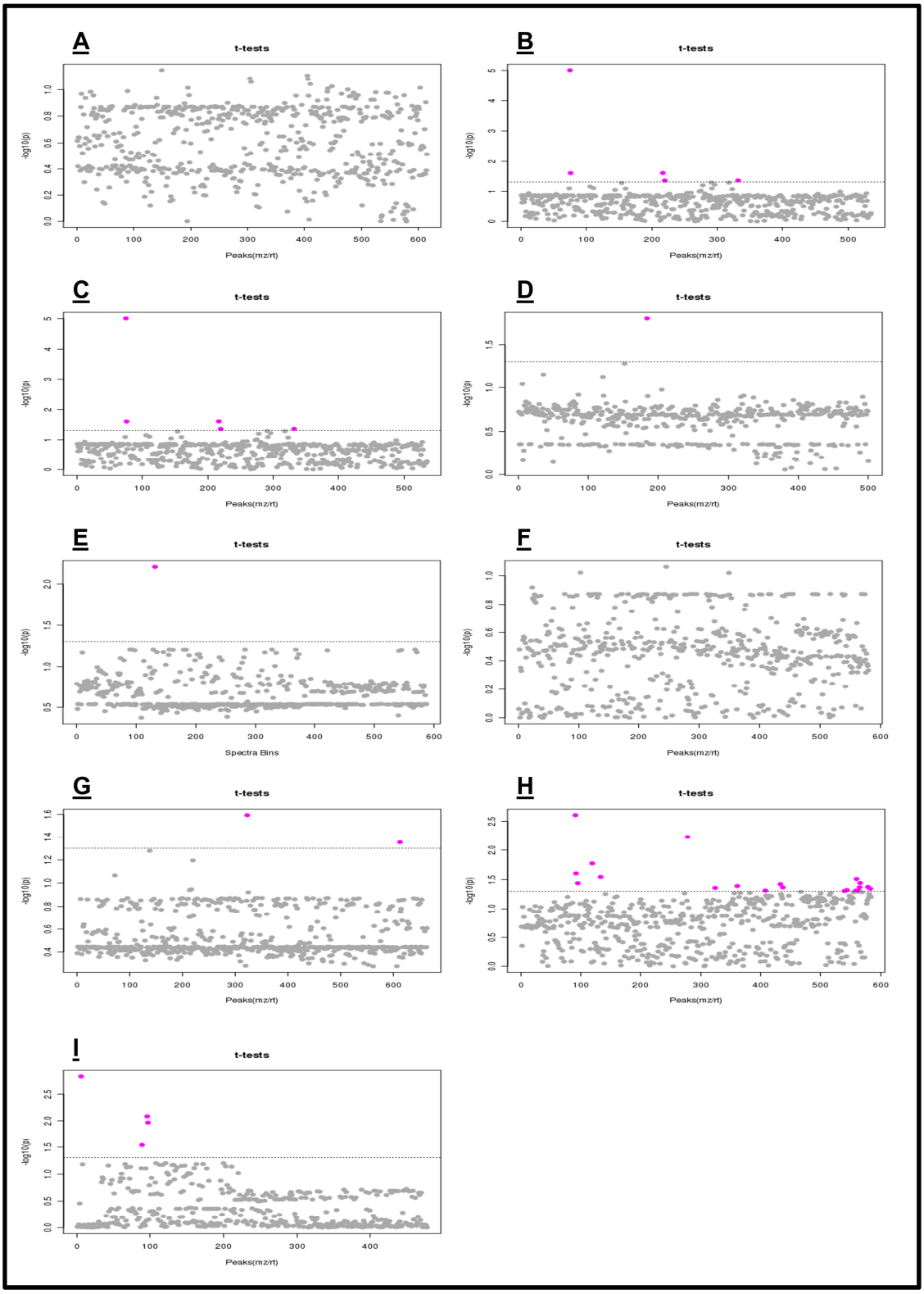


Figura 14 - Os círculos vermelhos representam íons acima do limiar. O fold change e os valores de p são transformados em log. As posições mais distantes do (0,0) são mais significantes. A- Animal 1; B- Animal 2; C- Animal 3, D- Animal 4; E- Animal 5; F- Animal 6; G- Animal 7; H- Animal 8 e I- Animal 9

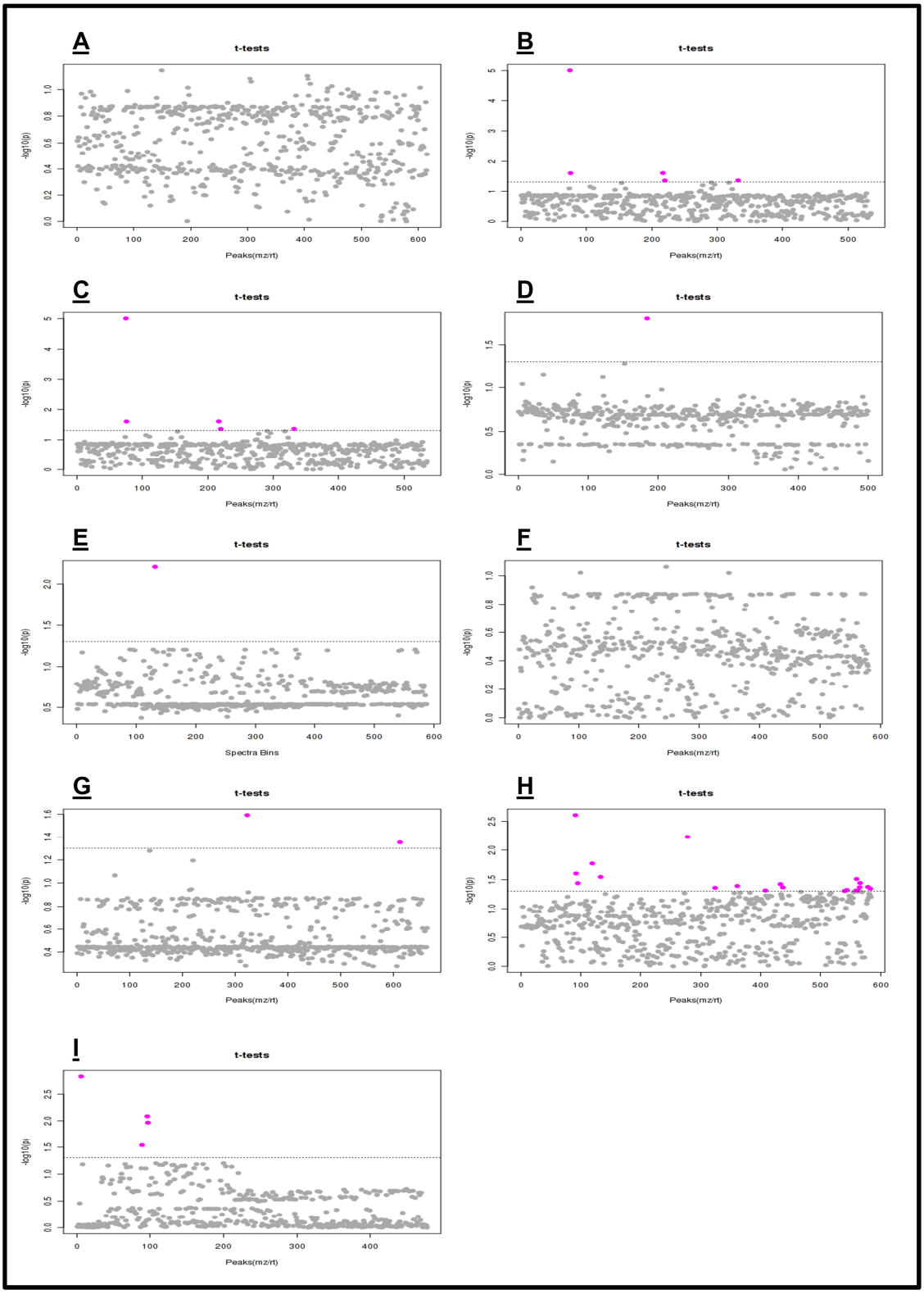
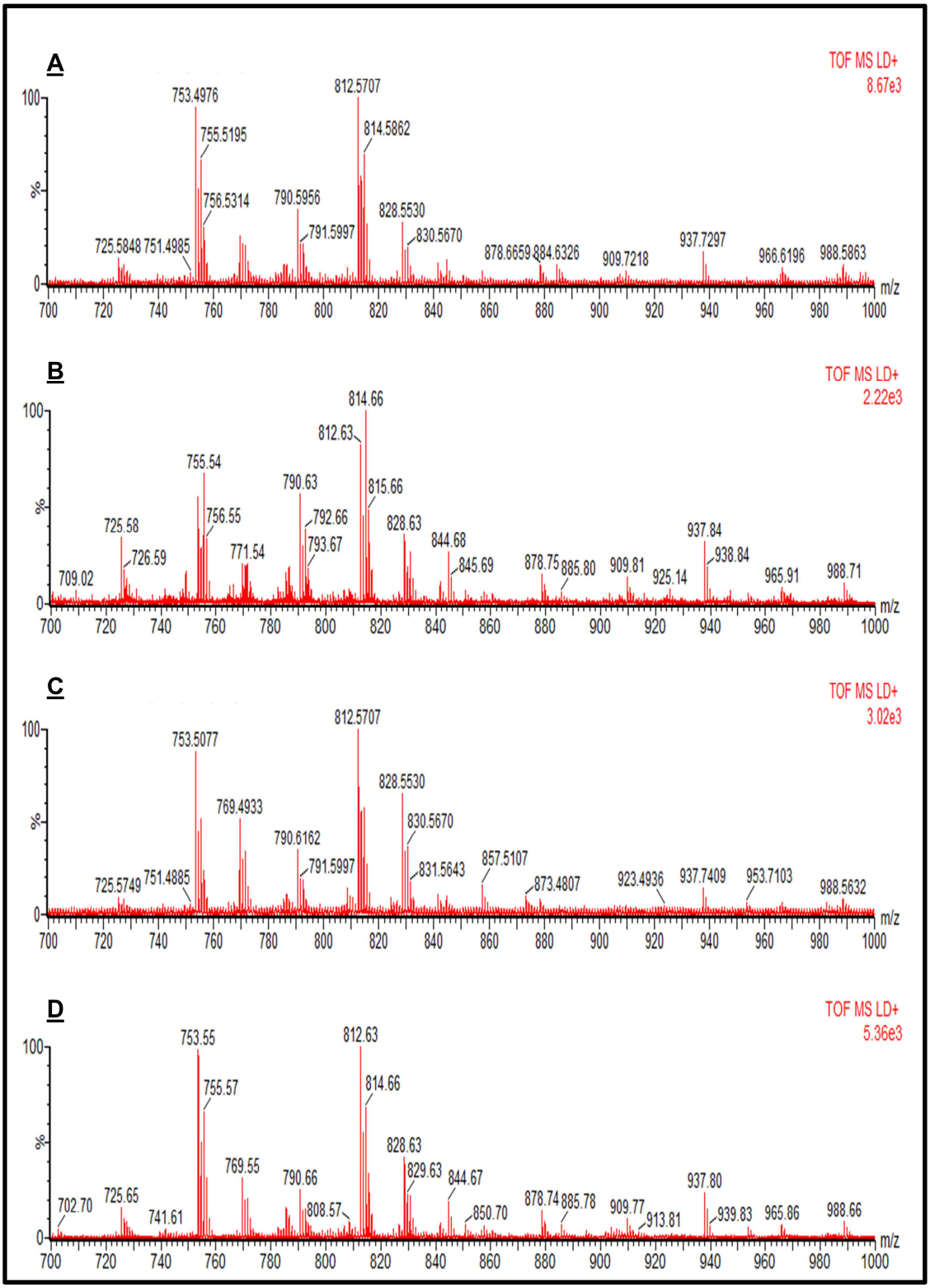


Figura 15 - Os espectros representam os principais perfis lipídicos dos sêmens de animais controles (A e B) e de animais tratados (C e D). A- Animal 1; B- Animal 9; C- Animal 4 e D- Animal 6



Os principais íons representativos encontrados pelos métodos test-t, Volcano Plot e os íons identificados nos espectros são descritos na quadro 2 abaixo.

Quadro 2 - Principais íons e suas devidas classificações identificados por animal durante o período de coletas pelos métodos utilizados e representados pelos espectros

m/z	***Classificação***
700.4	PC 30:3
702.6	PC 30:2
760.3	PS (34:2)
766.3	PE 38:5
769.4	PC (16:0/22:6)
782.7	PC 36:4
812.5	PC 38:3
814.6	PC 38:2
828.5	PC (16:0/22:6) + Na
830.5	PC 16:0/22:5 + Na+
844.6	PC 40:1
909.7	PI (18:0/18:1)+ 2Na+

Analisando os resultados obtidos pelos animais durante o período das coletas, é possível observar que a fosfatidilcolina está presente no sêmen de todos os animais, uma vez que ser um componente lipídico muito encontrado em membranas (CHRISTIE, 2010), a fosfatidilcolina também é capaz de proporcionar fluidez na membrana e isso ajuda a controlar os níveis de colesterol encontrados na membrana (JÄGER et al., 2007)**.**

A esfingomielina foi encontrada em maior intensidade em quatro animais, sendo eles os animais 1, 4, 5 e 9. Segundo Cristhie (2010), a esfingomielina e o

colesterol têm uma grande afinidade entre eles e são geralmente localizados juntos em determinadas regiões das membranas e na superfície das partículas de lipoproteína, além de controlar a distribuição do colesterol nas células.

Os animais 1, 4 e 7 apresentaram maior intensidade do íon classificado por fosfatidiletanolamina que também está comumente presente nas membranas celulares e que pode ser formado pela reação enzimática de etanolamina com fosfatidilserina, ou por reacilação de lisofosfatidiletanolamina (CHRISTIE, 2010).

No animal 2 observou-se a presença de fosfatidilinositol que é considerado um lipídio importante encontrado nas membranas por transporte vesicular ou através de proteínas de transferência. O fosfatidilinositol também tem papel crucial na ligação interfacial de proteínas e na regulação da proteínas na interface celular (CHRISTIE, 2010).

O fosfatidilserina foi um lipídio encontrado apenas no amimal 9. O fosfatidilserina está localizado principalmente na camada interna da membrana celular e tem uma variedade de funções estruturais e regulatórias, como por exemplo, modular a atividade dos receptores, canais iônicos, enzimas e moléculas de sinalização e está envolvido na membrana que regulam a fluidez (CHRISTIE, 2010).

Sendo assim, da mesma forma, não foram observadas diferenças significativas no perfil lipídico dos animais ao longo do tempo, o que demonstra que a suplementação com vitaminas A, D e E não levou a alterações na composição lipídica dos espermatozoides.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho permitem concluir que:

O método de análise direta além de ser um método mais simples e rápido, pode gerar um perfil lipídico tão significativo quanto o método de extração lipídica.

É possível observar um perfil lipídico muito semelhante entre animais controles e tratados e a suplementação com vitaminas A, D e E não interfere nas características dos perfis lipídicos dos espermatozoides.

Não foram observadas diferenças entre o mesmo animal ao longo do tempo, o que demonstra que a suplementação com vitaminas A, D e E não levou a alterações na composição lipídica dos espermatozoides.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. F. M. **Determinação de elementos essenciais e tóxicos em sêmen bovino utilizando a espectrometria de massas com plasma acoplado (ICP-MS) com introdução direta da amostra.** 2010. 88 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

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

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; NEVES, L. C. **Influência da qualidade do sêmen nos resultados de prenhez em programas de IATF e TETF.** 2009. p. 157-164. Disponível em: <http://www.geraembryo.com.br/t.tecnicos/p4/rubens_paes.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2010.

ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. **importação, exportação e comercialização de sêmen.** 2011. p.1-21. Disponível em: <http:// http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/relatorio2011.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2012.

BEER-LJUBIC, B.; ALADROVIC, J.; MARENJAK, T. S.; LASKAJ, R.; MAGIC-BALIC, I.; MILINKOVIC-TUR, S. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality sêmen evaluation. **Elsevier**. v. 72, p. 1132-1140, 2009.

BERTOZZO, B. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Efeito da adição de colesterol ao meio de incubação do sêmen bovino congelado sobre a integridade das membranas plasmática e acrossomal. 2009. 10 f. Disponível em: <<http:www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=431>>. Acesso em: 25 jan. 2010.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G.. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta**. Revista. Nutrição. [online]. v.12, n. 2, p. 123-130, 1999. ISSN 1415-5273

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARAES, J. D.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.

Membrana plasmática de espermatozóides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Reprodução Animal,** v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.

CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. **Biologia da Reprodução,** v. 57. p. 1293-1301, 1997.

CASTILHO, E. F GUIMARÃES, J. D.; MARTINS, L.F.; PINHO, R.O.; GUIMARÃES, S.E.F.; ESPESCHIT, C.J.B. **Uso de própolis e ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino**. **Revista Brasileira de Zootecnia** [online]. v. 38, n. 12, p. 2335-2345, 2009,. ISSN 1516-3598.

CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 2005. 188 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T. M. Changes in sperm
DOMINGUES, R. **Espectrometria de massa**: quais suas aplicações na análise de alimentos. 2009. Disponível em: <http://www.utad.pt/pt/eventos/ii_ciclo_coloquios/05julho09.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2011.

CHRISTIE, W. W. **Lipidomics – A personal view.** 2010. Disponível em: <http:// http://lipidlibrary.aocs.org/topics/lipomics/index.htm>. Acesso em: 22 set. 2010.

DIAS, J. C.; ANDRADE, V.J.; MARTINS, J.A.M.; EMERICK, L.L.; VALE FILHO, V.R. Correlações genéticas e fenotípicas entre características reprodutivas e produtivas de touros da raça Nelore. **Pesquisa agropecuária brasileira.** v. 43, n. 1, p. 53-59, 2008. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/pab/v43n1/a08v43n1.pdf >. Acesso em: 22 set. 2010.

FERREIRA, C. R.; SOUZA, G. H. M. F.; FONSECA, M. F. R.; SANVIDO G. B.SANVIDO G. B.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; EBERLIN, M. N. Quality control of media for in Vitro bovine embryo production using automated chip-based nanoelectrospray mass spectrometry. In: 56. CONGRESSO DA ASSOCIAÇÃO AMERICANA DE

ESPECTROMETRIA DE MASSAS, 56., 2008,

FERREIRA, C. R.; SARAIVA, S. A.; GARCIA, J. S.; SANVIDO, G. B.; PERECIN, F.; CATHARINO, R. R.; SIMAS, R. C.; GOZZO, F. C.; SANTOS, L. F. A.; MARTINS JUNIOR, H.; BASSO, A. C.; PONTES, J. H. F.; COELHO, M. B.; DANGELO, M.; EBERLIN, M. N. Princípios e aplicações da espectrometria de massas em produção animal. In: SIMPÓSIO DE BIOLOGIA MOLECULAR APLICADA À PRODUÇÃO ANIMAL, 2., 2009, São Carlos. **Anais** São Carlos-SP: Embrapa Pecuária Sudeste - São Carlos, 2009

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemica Biophysica Acta** v. 1469, p. 197–235, 2000.

FUCHS, B.; MÜLLER, K.; GÖRITZ, F.; BLOTTNER, S.; SCHILLER, J. Characteristic oxidation products of choline plasmalogens are detectable in cattle and roe deer spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry. **Lipids, v.** 42, p. 991-998, 2007.

FUCHS, B.; JAKOP, U.; GÖRITZ, F.; HERMES, R.; HILDEBRANDT, T.; SCHILLER, J.; MÜLLER, K.; MALDI-TOF "fingerprint" phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloideae spermatozoa. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 568-575, 2008.

GERENA, R. L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Identification of a fertilityassociated protein in bull seminal plasma as lipocalintype prostaglandin D synthase**. Biologia da Reprodução.** v. 58, p. 826-833, 1998.

GLASER, F. D. **Aspectos comportamentais de bovinos das raças Angus, Caracu e Nelore a pasto frente à disponibilidade de recursos de sombra e água para imersão.** 2007. 117f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

JAGER, R.; PURPURA, M.; KINGSLEY, M. Phospholipids and sports performance. **Journal of the International Society of Sports Nutrition, v.4, n. 5 ,** p. 1-8, 2007.

JANETT, F.; THUN, R.; BETTSCHEN, S.; BURGER, D.; HASSIG, M. Seasonal changes of

semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallions. **Animal Reproduction Science** v. 77, p. 213–221, 2003.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.;TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology,** v. 61, p. 255–266. 2004.

KILLIAN, D. B.; GARVERICK, H. A.; DAY, B. N. Peripheral plasma progesterone and corticoid ievels at parturition in the sow. **Journal of Animal Science**. v. 37. p. 1371-1375, 1973.

LEISSIG, J.; GEY, C.; SUSS, R.; SCHILLER, J.; GLANDER, H-J.; ARNHOLD, J. Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and 31P NMR spectroscopy. **Compara Biochemistray Physiology.** v. 137, p. 265–277, 2004.

MARTINS, J. F. P. **Comportamento do complexo DNA-proteina, do vigor e da motilidade de espermatozoides de touros submetidos a diferentes tempos de congelação**. 1997. 147 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biologicas) – Univesidade de Campinas, Campinas, 1997.

MERTINS, O. SEBBEN, M.; SCHNEIDER, P.H.; POHLMANN, A.R.; SILVEIRA, N.P. Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de ^{1}H e de 31P. **Química. Nova** [online]. v.31, n.7, p. 1856-1859, 2008. ISSN 0100-4042. doi: 10.1590/S0100-40422008000700043.

MILNE, S.; IVANOVA, P.; FORRESTER, H.; BROWN A. Lipidomics: an analysis of cellular lipids by ESI-MS. **Elsevier.** 2006, v. 39, p. 92-103, 2006.

MORAES, E. A.; TORRES, C. A. A.; GUIMARAES, J. D.; MURGAS, L. D. S. Efeito de fontes de óleo e níveis de suplementação de vitamina E na ração sobre as características físicas e morfológicas do sêmen *in natura* de suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 62, n. 3, p. 521-527, 2010. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v62n3/04.pdf >. Acesso em: 22 set. 2012.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. **Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos**. Revista Nutrição v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004. Disponível em < http://www.scielo.br/pdf/rn/v17n4/22890.pdf>. Acesso em 22 set. 2012.

MÜLLER, K.; POMORSKI, T.; MU¨LLER, P.; HERRMANN, A. Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. **Journal of Cell Science.** v. 112, p. 11–20, 1999.

PARKS, J.; LYNCH, D. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology,** v. 29, p. 255–266, 1992.

PARKS, J. E.; ARION, R. H. Foote, Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa, **Biologia da Reprodução** v. 37, p. 1249–1258, 1987.

RIPAMONTE, P. **Estimativa da participação do programa do genoma de *Bos taurus* no rebanho Nelore.** 2002. 57 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2002.

RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P. H.; LIMA, V. F. M. H.; RODRIGUES, L. H.; OLIVEIRA, M. A.; SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science,** v.36, 1999.

SALLA CARDOSO, P. B. **Método de extração para determinação do perfil lipídico do sêmen ovino através do HPLC.** 2009. 79f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SCHILLER, J.; MÜLLER, K.; SUSS, R.; ARNHOLD, J.; GEY, C.; HERRMANN, A.; LESSIG, J.; ARNOLD, K.; MÜLLER, P. Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry – a cautionary note. **Chemistry Physics of Lipids.** v. 126, p. 85–94, 2003.

SHIROMA, M. Y. M.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Efeito da adição de ácido graxo poliinsaturado ao meio de incubação do sêmen bovino congelado sobre a integridade das membranas

plasmáticas e acrossomal. 2009. 8f. Disponível em: <http://www.propp.ufms.br/gestor/titan.php?target=openFile&fileId=432>. Acesso em: 25 jan. 2010.

SIQUEIRA, J. B. **Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática "in vitro".** 2004. 77 f. Tese (Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

SOBRINHO, C. A. B. **Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozóides criopreservados de cães.** 2009. 101 f. Tese (Medicina Veterinária e Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

STARKS, M. A.; STARKS, S. L.; KINGSLEY, M.; PURPURA, M.; JÄGER, R. The effects of phosphatidylserine on endocrine response to moderate intensity exercise. **Journal of the International Society of Sports Nutrition. v.5, n. 11,** p. 1-6, 2008.

STÜBIGER, G.; BELGACEM, O. Analysis of lipids using 2,4,6-trihydroxyacetophenone as a matrix for MALDI mass spectrometry. **Analytical Química,** v. 79, n. 8, p. 3206-3213, 2007.

ZALATA, A. A.; CHRISTOPHE, A. B.; DEPUYDT, E.; SCHONJANS, F.; COMHAIRE, F. H. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. **Molecular Human Reproduction.** v. 4, p. 111–118, 1998.