**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**
**DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**EMANUEL LIMAVERDE VILAR**

# QUANTIFICAÇÃO E EFLUXO DE COLESTEROL TOTAL E HDL DOS ESPERMATOZÓIDES DO EJACULADO DE CAPRINOS

FORTALEZA-CE
Fevereiro de 2010

# Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

**EMANUEL LIMAVERDE VILAR**

# QUANTIFICAÇÃO E EFLUXO DO COLESTEROL TOTAL E HDL DOS ESPERMATOZÓIDES DO EJACULADO DE CAPRINOS

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Zootecnia – Área de Concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Professora Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos.

FORTALEZA-CE
Fevereiro de 2010

**EMANUEL LIMAVERDE VILAR**

# QUANTIFICAÇÃO E EFLUXO DO COLESTEROL TOTAL E HDL DOS ESPERMATOZÓIDES DO EJACULADO DE CAPRINOS

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de mestre em Zootecnia – Área de Concentração: Reprodução Animal.

**Dissertação aprovada em __/__/___**

**BANCA EXAMINADORA**

_____
Professora Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos
ORIENTADORA

_____
Professor Dr. Arlindo Alencar Araripe Noronha Moura
CO-ORIENTADOR (UFC)

_____
Professor Dr. Gyselle Viana Aguiar
CONSELHEIRA (UFC)

_____
Professor Dr. José Ferreira Nunes
CONSELHEIRO (UFC)

**QUANTIFICAÇÃO E EFLUXO DOS COLESTERÓIS TOTAL E HDL DOS ESPERMATOZÓIDES DO EJACULADO DE CAPRINOS**

Ficha catalográfica elaborada pelo Bibliotecário Hamilton Rodrigues Tabosa CRB-3/888

V747q Vilar, Emanuel Limaverde
Quantificação e efluxo de colesterol total e HDL dos espermatozóides do ejaculado de caprinos / Emanuel Limaverde Vilar. -- Fortaleza, 2010.
54 f.; il.; enc.

Orientadora: Profa Dra.Ana Cláudia Nascimento Campos
Co-orientador: Arlindo Alencar Araripe Noronha Moura
Área de concentração: Reprodução Animal
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Depto. de Zootecnia, Fortaleza, 2010.

1. Caprino. 2. Plasma seminal. I. Campos, Ana Cláudia Nascimento (Orient.). II. Moura, Arlindo Alencar Araripe Noronha (Co-orient.). III. Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em Zootecnia. III.Título.

CDD 636.08

**As minhas irmãs Dária e Dábula e meu irmão Thibério.**

OFEREÇO

**Aos meus pais, Fernando, pelo incentivo, confiança e amor a mim prestados e Valdene, pelo seu eterno amor. A minha namorada Michelle pelo apoio.**

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, nos ruins me amando, ensinando e dando forças e nos bons me alegrando e amando.

Aos meus pais Fernando e Valdene, que me proporcionaram uma segunda vida. Vocês foram sem duvida a maior graça que Deus me concedeu. Seu amor e suas lições serão responsáveis por todas minhas vitórias. “São meus eternos heróis”.

A meus irmãos Thibério, Dária e Dábula pelo apoio em todas as minhas conquistas.

A minha namorada Michelle que depois dos meus pais é a grande responsável pelas minhas conquistas. Sua dedicação, compreensão e amor me deram suporte para alcançar meus objetivos. “Sem você, eu não seria o que sou hoje”.

Aos meus grandes amigos, Ítalo e Madson que nunca desistiram de mim, e sempre me apoiaram e ajudaram a chegar mais longe e atingir meus objetivos.

A Professora Dra. Ana Cláudia Nascimento Campos, pelos preciosos ensinamentos e orientação imprescindíveis para minha formação profissional, os quais tornaram possível a execução desta pesquisa e a sua valiosa amizade que, com seus conselhos, possibilitou meu crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. Arlindo Moura, pela atenção e co-orientação.

As minhas colegas, Ana Gláudia e Gyselle Aguiar pelos conselhos e correções dessa dissertação.

Aos mestres que me apoiaram em todo esse caminho, Fátima Révia, Carla Renata e Hélio Manso.

À Universidade Federal do Ceará – UFC e Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, por proporcionar minha capacitação profissional.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado.

Aos meus familiares que com suas orações e palavras de apoio me ajudaram em toda minha vida acadêmica.

A “Dona Dôra”, “Seu Audir”, Paulinha e Matheus, pelas orações, amizade e pela paciência.

Aos integrantes do Laboratório de Estudos em Reprodução Animal (LERA) da UFC, alunos dos cursos de graduação em Zootecnia e Agronomia da UFC, Jeane Ferreira, Gabriel, Francisco (Chico), Adália, Camila, Wandeórgenes (Wando), Rafael Soares, Ítalo Cordeiro, Pedro (Bó), Marco Antônio, Rubens, Karol, Fabiano (Amizade) e Diego pela disponibilidade, amizade e momentos de descontração que tornaram nosso trabalho mais prazeroso, sem vocês a execução desse trabalho teria sido ainda mais difícil. Essa conquista é nossa.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para essa conquista.

Meus sinceros agradecimentos!

# RESUMO

Objetivou-se mensurar a taxa de colesterol presente no plasma seminal (PS) de caprinos, e verificar se ocorre efluxo de colesterol dos espermatozóides para o PS, e como tal evento ocorre individualmente após uma hora de incubação a 38 °C. O experimento foi conduzido no Laboratório de Estudos em Reprodução Animal da UFC. Foram utilizados oito bodes criados intensivamente e alimentados segundo o NRC/caprinos (1981). Os ejaculados coletados foram divididos em três alíquotas. A primeira foi centrifugada para obtenção do PS, que foi acondicionado em tubos eppendorfs e armazenado a -18 °C. A segunda alíquota foi incubada a 38 °C / 1 h e depois centrifugada para obtenção do PS. Essas duas alíquotas foram analisadas quanto ao nível de colesterol total e HDL. A terceira alíquota foi diluída em citrato de sódio – glicose e submetida ao teste termorresistência, para avaliação do vigor, motilidade, células espermáticas normais e alterações morfológicas totais. O delineamento experimental empregado foi de blocos casualizados, para a análise dos dados utilizou-se o programa estatístico SAS$^{@}$ 9.0. Foram observadas diminuições significativas do vigor e da motilidade entre os tempos de incubação. Entretanto, na maioria dos animais ocorreu estabilização dos parâmetros a partir de 60 min de incubação. Pequena diferença foi observada entre os indivíduos para estes parâmetros. O nível de colesterol total encontrados no PS de caprinos aumentou significativamente após a incubação em 50% dos animais. Antes e após a incubação, o nível de colesteróis total e HDL variaram significativamente entre os indivíduos. A proporção de colesterol HDL no PS foi muito elevada, os valores foram 83,79% e 78,41%, respectivamente. Foi observada uma associação significativamente ($p<0,01$) positiva e moderada, entre a proporção de HDL e o vigor espermático ($r = 0,30$) e entre a motilidade e a proporção de HDL foi considerada pequena ($r = 0,19$). Concluiu-se que o PS de caprinos contém uma alta proporção de colesterol e o principal colesterol presente é o HDL.

# 1. INTRODUÇÃO

Os lipídios possuem funções importantes no processo reprodutivo e na manipulação do sêmen resfriado e congelado. Maldjiana *et al.* (2005) explanou que a presença desses compostos são essenciais para todos os diluidores utilizados durante o resfriamento e congelamento. O sêmen caprino pode ser conservado sob refrigeração a 4 ºC, podendo ser utilizado em um curto espaço de tempo, ou ainda congelado a -196 ºC em nitrogênio líquido, o que possibilita a sua utilização por um longo período de tempo. O primeiro diz respeito à eventual troca de componentes lipídicos entre a membrana plasmática dos espermatozóides e a gema de ovo como base diluidora durante a criopreservação, sendo o principal lipídio a fosfatidil-colina, e a interação desse a superfície da membrana é a chave deste processo de crioproteção (PERES, 2006). O efeito benéfico da gema de ovo é atribuído, principalmente, à lipoproteína de baixa densidade (LDL), a qual se liga as proteínas do plasma seminal evitando a saída de colesterol e fosfolipídios (BERGERON *et al.*, 2004).

A relação entre os constituintes lipídicos e a qualidade do sêmen fresco é considerada. O outro aspecto diz respeito à possibilidade de aumentar a congelabilidade do sêmen, alterando a membrana plasmática sob a influência de ácidos graxos (MALDJIANA *et al.*, 2005).

Espermatozóides de melhor qualidade, a fresco, acumularam a maior quantidade de lipídios após descongelar. A diminuição geral na proporção de ácidos graxos poliinsaturados foi observada após o descongelamento. A capacidade de lipoproteínas da gema de se vincular fortemente a membrana plasmática foi relatada para touros (VISHWANATH e SHANNON, 2000). Além disso, os espermatozóides são capazes de trocar os componentes lipídicos com o ambiente extracelular (VASQUEZ *et al.*, 1997).

A bicamada lipídica presente na membrana não é simplesmente um meio de passagem passivo, nela estão presentes receptores moleculares que recebem sinais específicos, sendo assim uma estrutura bastante especializada (LENZI *et al.*, 1996).

Scott *et al.* (1967) sugeriram que os lipídios são uma fonte de substrato que permitem a maturação dos espermatozóides durante a passagem e estocagem no epidídimo e ainda relata que a composição e o metabolismo desses lipídios são diferentes nos espermatozóides testiculares e ejaculados. Relatos afirmam que as células espermáticas usam os lipídios nas suas vias metabólicas para a produção de uma parte

da sua energia e que a maturação completa dos lipídios na membrana espermática é atingida no trajeto através do epidídimo (LENZI *et al.*, 1996).

As membranas biológicas contêm colesterol, que é o responsável por aumentar a ordem e a rigidez da bicamada lipídica (CAMPBELL, 2000). O colesterol presente na membrana plasmática tem recebido muita atenção, pois o mesmo exerce vários papéis em todas as membranas biológicas, tais como a regulação da orientação, fluidez e a espessura das membranas lipídica. Além disso, o colesterol é considerado um componente lipídico chave, porem mais estudos acerca da ação desse lipídio durante os processos de capacitação e reação acrossomal devem ser realizados para comprovação dessa afirmação (VASQUEZ *et al.*, 1997). Em mamíferos, o colesterol perdido pelos espermatozóides durante a capacitação tem sido demonstrado em muitas espécies incluindo bovinos, coelhos, ratos e humanos (GO e WOLF, 1985).

Apesar da importância do colesterol removido da membrana plasmática para o processo de capacitação ter sido extensamente estuda, parece que a fase de separação dos fosfolipídios e do colesterol da membrana é mais importante para a capacitação do que a remoção completa do colesterol da membrana (FLESCH e GADELLA, 2000).

Em bovinos o colesterol é o principal esteróide livre encontrado no plasma seminal (PARKS *et al.*, 1987). O colesterol no plasma sanguíneo e seminal possui diferenças na concentração em função da época do ano e nesta espécie, esse esteróide tem sido indicado como marcador bioquímico de qualidade dos espermatozóides (BEER-LJUBIC *et al.*, 2009).

O plasma seminal de caprinos não possui relatos na literatura sobre a concentração de colesterol total e de HDL. No mesmo não há conhecimento da existência de fatores que promovam o efluxo de colesterol da membrana celular para o plasma seminal de animais criados em clima tropical. Uma melhoria da conservação do sêmen caprino ocorrerá quanto maior for à compreensão desses aspectos, contribuindo assim para a adoção de novas técnicas.

No plasma seminal de bovinos estão presentes proteínas específicas denominadas BSPs (Bovine Seminal Plasma) que promovem modificações na membrana lipídica do espermatozóide estimulando a saída de colesterol e promovendo a capacitação dessas células (THÉRIEN *et al.*, 1995), além disso, essa família de proteínas interagem com o colesterol HDL presente no aparelho reprodutor feminino propiciando o efluxo de colesterol e de fosfolipídios da membrana espermática (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002).

O objetivo deste estudo foi mensurar a taxa de colesterol presente no plasma seminal de caprinos, bem como, verificar se ocorre efluxo de colesterol dos espermatozóides para o plasma seminal e como tal evento ocorre individualmente, após uma hora de incubação a 38 °C.

# 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1. Lipídios

Os lipídios são compostos que ocorrem com bastante freqüência na natureza e são importantes componentes de membranas plasmáticas de plantas e animais, geralmente são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos (CAMPBELL, 2000). Segundo o mesmo autor, os lipídios, em função de sua natureza química dividem-se em dois grupos; os de cadeia aberta com cabeças polares e longas caudas apolares (ácidos graxos, triacilgliceróis, esfingolipídios, fosfoacilgliceróis e glicolipídios) e os compostos de cadeia cíclica (esteróides), um representante importante deste é o colesterol.

Na membrana espermática, estudos pioneiros da bioquímica de espermatozóides de mamíferos e não mamíferos mostraram a presença de ácidos graxos neutros, colesterol, fosfolipídios (principalmente lecitina, cefalina e esfingomielina) e glicolipídios (SANO *et al.*, 1922). As espécies mamíferas possuem diferenças nos níveis de lipídios presentes na membrana plasmática, mas em geral contém aproximadamente 70% fosfolipídios, 25% lipídios neutros e 5% de glicolipídios (FLESCH e GADELLA, 2000).

Em alguns mamíferos, como por exemplo, em carneiros foram demonstrados a reorganização completa da estrutura da membrana, tanto de proteínas e lipídios durante a passagem do esperma através do epidídimo (WOLF *et al.*, 1986). Quando os espermatozóides humanos passam da cabeça a cauda do epidídimo pode ocorrer à fluidez de seu biomembrana, isso conforme o grau de insaturação (associado com os componentes de ácidos graxos de fosfolipídios) (LENZI *et al.*, 1996).

Os espermatozóides têm uma composição lipídica únicas, porque são células diferenciadas. O perfil lipídico dos espermatozóides durante sua diferenciação, a maturação epididimária e o trânsito no aparelho reprodutor feminino, sofrem modificações que causam alterações na fluidez da membrana e na capacidade de resposta ao ambiente exógeno. Essas modificações estão envolvidas em eventos fisiológicos, como hiperativação, capacitação e reação acrossômica, que são cruciais para penetrar a zona pelúcida e a capacidade de fertilização dos espermatozóides (CASTELLINI *et al.*, 2006).

Os lipossomos que compõem o colesterol e a fosfatidilserina protegem os espermatozóides de bovinos e garanhões dos danos do processo de congelamento, possivelmente por prevenir as alterações deletérias do processo de resfriamento (WILHELM *et al*., 1996).

A capacidade dos espermatozóides testiculares de sintetizarem lipídios é maior do que o das células do ejaculado, sendo que os espermatozóides testiculares possuem 25% mais fosfolipídios que o ejaculado (SCOTT *et al.*, 1967).

A capacitação do espermatozóide é acompanhada de uma mudança na composição lipídica de sua membrana plasmática, fato esse acompanhado em inúmeros estudos (THÉRIEN *et al.*, 1998). Mais especificamente, a capacitação envolve um decréscimo na relação de colesterol: fosfolipídio na membrana (DAVIS, 1981). A região acrossômica que recobre a vesícula acrossômica, constitui a única área sensível aos estímulos de capacitação da bicamada lipídica da membrana. O processo de fusão entre sua membrana interna e a vesícula acrossômica externa iniciam-se após várias etapas de capacitação que induzem o aumento da fluidez da membrana na região (LENZI *et al.*, 1996). O mesmo autor relatou que as teorias atuais de fusão das membranas sugerem que, a fluidez da membrana é um pré-requisito para funções das células normais e que a fluidez e a flexibilidade das membranas celulares são principalmente dependentes de sua constituição lipídica.

A composição lipídica da membrana sofre inúmeras mudanças no decorrer da vida dos animais, como foi proposto no trabalho de Davis *et al.* (1966), em ratos de 3 semanas. Nos testículos em maturação foram encontrados uma redução na concentração de ácido esteárico e ácido oléico em triglicérides, uma redução na concentração de ácido oléico em fosfolipídios. Esses autores discutem ainda que essas alterações podem ser devido ao amadurecimento das células de Sertoli, aumento da atividade das células de Leydig, dentre outros fatores.

A composição e o metabolismo dos lipídeos presentes nos espermatozóides são diferentes ao longo do trajeto que esse faz pelo epidídimo, permitindo o importante processo da maturação (SCOTT *et al.*, 1967). As concentrações de lipídios totais e de colesterol e a redução na motilidade espermática tiveram diferenças associadas com a estacionalidade (HOFFMANN e LANDECK, 1999).

## 2.2. Colesterol

### 2.2.1. Classificação e níveis de colesterol

O colesterol está presente nas membranas biológicas sendo responsável por aumentar a ordem e a rigidez da bicamada lipídica da membrana (CAMPBELL, 2000). Sabendo-se que os espermatozóides de mamíferos liberados no lúmen dos túbulos seminíferos são imóveis e incompetentes para a fecundação, esses devem sofrer os processos de maturação, capacitação e reação do acrossoma para tornarem aptos a fertilizar o óvulo (HAFEZ, 2004). Esse lipídeo é crucial para esses processos, sendo considerado um marcador de qualidade do sêmen, devido sua importância para obtenção dessa competência (VASQUEZ *et al.*, 1997).

O colesterol presente no plasma seminal humano provavelmente origina-se na próstata (ELIASSON, 1966). A quantidade e a distribuição do colesterol na membrana plasmática de espermatozóides alteram a capacitação, e ainda, acredita-se que são responsáveis pela modulação das vias de sinalização nas células espermáticas (VISCONTI *et al.*, 1999). A fluidez da membrana espermática é fortemente associada ao nível de colesterol e cálcio intracelular (KADIRVEL *et al.*, 2009). Esse autor ainda observou que a proporção de espermatozóides capacitados foi proporcional aos altos níveis de cálcio e com a fluidez da membrana, mas inversamente com os níveis de colesterol presentes, relações feitas após o descongelamento do sêmen.

Os níveis de colesterol são muito variados de espécie para espécie como podemos visualizar na tabela a seguir:

Tabela1: Quantidade de colesterol no plasma seminal de carneiro, touro, coelho e humano.

| ESPÉCIES | REPETIÇÕES | MICROGRAMA DE COLESTEROL/$10^9$ sptz | COLESTEROL/PLASMA SEMINAL (µg/mL) |
|---|---|---|---|
| Carneiro | 6 | 279,0 ± 23,3 | 73,9 ± 11,7 |
| Touro | 6 | 345,6 ± 26,8 | 74,0 ± 14,2 |
| Coelho | 5 | 545,3 ± 19,8 | 57,6 ± 3,2 |
| Humano | 5 | 555,9 ± 20,8 | 111,2 ± 7,4 |

Fonte: Darin-Bennet e White (1997)

Os níveis desse esteróide também podem variar de acordo com a estação do ano, foram encontrados níveis inferiores no verão (Julho e Agosto) em relação ao inverno (Novembro e Dezembro), assim como diferença nos níveis de ácidos graxos e fosfolipídios, conseqüentemente afetando a motilidade espermática, esse o aumento do nível de colesterol encontrado no plasma seminal coletado no inverno provavelmente resultou a diminuição de sua concentração intracelular (ARGOV *et al.*, 2007). O nível de colesterol presente no espermatozóide testicular é duas vezes maior do que nos espermatozóides ejaculados (SCOTT *et al.*, 1967).

As lipoproteínas plasmáticas podem ser classificadas de acordo com a sua densidade: (I) HDL (high-density lipoprotein), lipoproteína de alta densidade; 30-60% proteína; 1,06-1,13 de densidade, (II) as LDL (low-density lipoprotein), lipoproteína de baixa densidade, (III) as IDL (Intermediate density lipoprotein) proteína de densidade intermediaria, (IV) as VLDL (very low-density lipoprotein), lipoproteínas de muito baixa densidade e (V) os quilomicras (1-2% proteínas; < 0,95 de densidade). Quanto maior é a percentagem de proteínas e menor a de triacilgliceróis maior é a sua densidade (FONTES, 2006).

As HDL são sintetizadas e secretadas pelo fígado e pelos intestinos (SWENSON e REECE, 1996). Beer-Ljubic *et al.* (2009) encontraram uma concentração de colesterol total e LDL significantemente maior no inverno do que na primavera em touros mais velhos (5 a 10 anos). A concentração de colesterol total no plasma seminal de touros jovens (2 a 4 anos) foi maior na primavera do que no verão e para touros velhos, foi significantemente maior no inverno do que no outono. Os níveis de colesterol também variaram (diminuem) quando comparados a fresco (21,67 ± 1,36 g/$10^8$ spz) e após congelamento / descongelamento (12,89 ± 1,03 g/$10^8$ spz) do sêmen (KADIRVEL *et al.*, 2009).

Fontes (2006) mostrou que, com exceção dos ácidos graxos livres (que são transportados ligados a albumina), os lipídeos são, no plasma sanguíneo, transportados em estruturas “micelares” (substâncias que na sua estrutura possuem uma porção polar e outra apolar - substância anfipáticas) denominadas lipoproteínas. As lipoproteínas plasmáticas contêm, no centro, lipídeos hidrofóbicos (triacilgliceróis e ésteres de colesterol) e no exterior, em monocamada, lipídeos anfipáticos (fosfolipídios e colesterol) associados a proteínas apoliproteínas, essas participam no metabolismo dos lipídeos contidos nas lipoproteínas de diferentes maneiras.

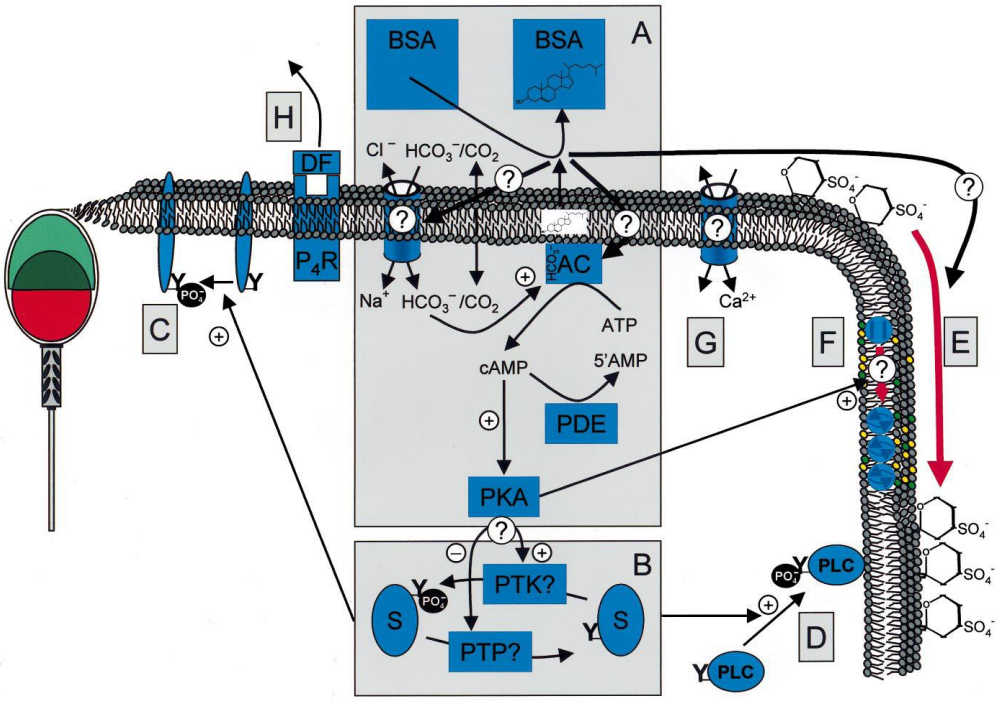
### 2.2.2. Efluxo de colesterol na capacitação das células espermática

Muitos estudos têm mostrado que albumina (GO e WOLF, 1985) e o HDL (THÉRIEN *et al.*, 1998) são receptores de colesterol. Foi observado que o efluxo de colesterol é estimulado pela a adição de albumina, mas esse processo apenas ocorre em resposta ao bicarbonato, ou seja, além de não possuir afinidade a outros componentes lipídicos, a albumina é bicarbonato-dependente para sua interação com o colesterol. O bicarbonato induz a primeira redistribuição lateral desse esteróide, facilitando a extração do mesmo pela albumina (FLESCH *et al.*, 2001).

A reação do acrossomo (fusão das membranas plasmática dos espermatozóides com a membrana externa subjacente acrossomal, evento $Ca^{2+}$ dependente) parece estar relacionada com as alterações lipídicas mediadas pelo bicarbonato e pela albumina (ZARINTASH e CROSS, 1996).

O HDL, juntamente com as proteínas BSP estimularam o efluxo de colesterol do espermatozóide epididimário e tiveram papel no início de eventos de modificação da membrana, esses que ocorrem durante a capacitação (ZARINTASH E CROSS, 1996), processo representado na figura 1. O HDL é a única classe de lipoproteínas presente no fluido do oviduto e folicular e ainda parece ser um aceptor de colesterol mais eficiente que a albumina (EHRENWALD *et al.*, 1990). A apolipoproteína A-I (ApoA-I) é a principal proteína do HDL plasmático, sendo importante para o transporte e o metabolismo desse lipídio (MANJUNATH *et al.*, 1989).

**Fig. 1. Seqüência proposta da capacitação espermática de mamíferos.**




(A) Bicarbonato pode entrar na célula espermática via canal iônico ou via de difusão como o dióxido de carbono. Bicarbonato intracelular inicia a Adenilato Ciclase (AC) e concomitante a produção de cAMP ativando a Proteína quinase A (PKA). O papel do efluxo de colesterol na ativação de PKA é pouco claro. O efluxo de colesterol pode induzir o aumento de Bicarbonato que entra ou pode afetar AC. (B) PKA induz a fosforização da tirosina (Y) de vários substratos (S) mais provavelmente via ativação de Proteína tirosina quinase (PTK) ou inibição de proteínas tirosina fosfatase (PTP). (C) Proteínas que comprometem a ligação Espermatozóide-ZP e outras proteínas da membrana plasmática tornam a tirosina fosforilada via bicarbonato induzindo a ativação de PKA. (D) Os citossólicos Fosfolipase C (PLC) são tirosina fosforilados via bicarbonato-PKA. A Tirosina fosforilada-PLC é subseqüentemente translocada para a membrana plasmática. (E) Ativação de PKA induz mudanças na membrana plasmática como redistribuição lateral de lipídios seminais e translocação de aminofosfolipídios. (F) Aminofosfolipídios são translocados pelo PKA. Muito provavelmente o efluxo de colesterol é envolvido nessa transição da membrana plasmática. (G) A entrada de pequenas quantidades de cálcio na célula espermática possivelmente tem um papel importante na capacitação. (H) Fatores de Descapacitação (DF) são removidos da superfície da célula espermática, receptores retirados como receptores de Progesterona (P4R).

Fonte: Flesch e Gadella, 2000.

A fluidez dos lipídeos da cabeça dos espermatozóides e da cauda na membrana espermática altera-se, segundo alguns relatos, como resultado da capacitação, sendo a movimentação do colesterol responsável em parte por tais mudanças (FLESCH e GADELLA, 2000).

Os espermatozóides de mamíferos, antes da fertilização, são ativados por altos níveis de bicarbonato, que facilitam o efluxo de colesterol mediado pelas lipoproteínas (FLESCH *et al.*, 2001). As células espermáticas devem sofrer o processo de capacitação e reação do acrossomo para serem capazes de fertilizar o óvulo (HAFEZ, 2004). Kadirvel *et al.* (2009) observando os espermatozóides após congelamento (-196ºC) e descongelamento relacionou a capacitação aos níveis de colesterol, à fluidez da membrana e à concentração de cálcio intracelular. Outros estudos evidenciaram que a membrana espermática submetida ao congelamento / descongelamento sofria alterações semelhantes, como a capacitação e / ou reação do acrossomo (MAXWELL e WATSON, 1996), sendo denominado de "criocapacitação" (BAILEY *et al.*, 2000). Essa perda de colesterol na criopreservação não é totalmente compreendida. No entanto, Ehrenwald *et al*., (1988) observaram que a maior perda desse lipídios é devido à difusão lenta da membrana celular e a uma transferência do mesmo para o meio externo nos espermatozóides de ratos e bovinos.

Os espermatozóides sofrem capacitação quando há um efluxo de colesterol da sua membrana lipídica (ZARINTASH e CROSS, 1996), esse processo leva a alterações na arquitetura da membrana, aumentando a permeabilidade da bicamada lipídica e da fluidez que é de suma importância para que essas células cheguem ao estado de capacitados (CROSS, 2003). A bicamada lipídica, *in vitro*, com a saída de colesterol aumenta sua desordem na sua estrutura fosfolipídica, aumentando a permeabilidade (CROSS, 1998). O cálcio extracelular, devido a essa fluidez induzida pelo colesterol, sofre um influxo causando o aumento intracelular desse íon. O colesterol ainda parece ser responsável por outros mecanismos de ajuste para a capacitação (KADIRVEL, 2009).

Thérien *at al.* (1998) verificaram que os espermatozóides epididimários de bovinos sofriam um efluxo de colesterol mais rápido nas primeiras 2 horas após incubação e então atingiam o platô após 4 horas, quando esses foram incubados com adição de diferentes doses de plasma seminal a 39 $^{o}$C por até 8h.

As células espermáticas de touro criopreservadas sofrem uma liberação de colesterol pela membrana, esse processo provavelmente causa danos peroxidativo nos lipídios ali presentes, podendo levar a uma capacitação prematura (CORMIER *et al.*, 1997).

Os espermatozóides humanos possuem uma relação entre o colesterol e a progesterona, que é observada pela indução da reação acrossômica por esse hormônio

(ZARINTASH e CROSS, 1996). Esses autores mostraram que após o processo de incubação *in vitro* 24 horas, houve uma incidência de perda de colesterol em torno de 29%, e a reação acrossômica espontânea dos espermatozóides, aumentou de 0,8% para 6.3% e a reação acrossômica induzida pela progesterona subiu de 0,7% para 21%. No mesmo estudo foi demonstrado também que os espermatozóides necessitaram de 10,8 h para que ocorressem 50% de efluxo de colesterol, e de 14,1 h para que 50% sofra reação do acrossomo.

Por outro lado observaram que o influxo de colesterol reduziu o ritmo espontâneo de reação acrossômica e conseqüentemente inibiu a fertilização, por inibir ou retardara a capacitação em muitas espécies (DAVIS, 1980). Confirmaram que o plasma seminal e as partículas seminais são ricos em colesterol e provavelmente agem como doadores de esterol (DAVIS, 1980), em uma tentativa de proteger os espermatozóides contra os choques ambientais e reação acrossômica prematura (DAVIS, 1981).

### 2.2.3. Atividade do colesterol na criopreservação dos espermatozóides

Alguns estudos comprovaram que o colesterol LDL promove à incorporação de fosfolipídios e colesterol a membrana e, também, previne a saída de fosfolipídios e colesterol da membrana espermática, através da formação de um complexo com as proteínas do plasma seminal. Dessa forma, conferindo a célula espermática uma maior resistência ao choque térmico, pois impede que as proteínas do plasma seminal fiquem disponíveis para atuarem na membrana espermática, evitando assim o efluxo de fosfolipídios e colesterol (BERGERON *et al.*, 2004).

A ação crioprotetora da LDL, similar a da gema de ovo, quando utilizada nos diluentes de criopreservação, tem sido comprovada na espécie eqüina, bovina, suína, canina, peixe e em outras espécies (DEMANIOWICZ e STRZEZEK, 1996).

Argov *et al.* (2007) evidenciaram, pela primeira vez, em espermatozóides bovinos a presença de receptores de VLDL (VLDLR), sugerindo a utilização, por essas células, de lipídios extracelulares. Os VLDLR se mostraram em uma quantidade três vezes maior no inverno (Novembro e Dezembro), evidenciando uma maior capacidade criopreservante desses espermatozóides. Esses receptores possuem um papel importantíssimo no metabolismo lipídico, pois prolongam a energia e o fornecimento de metabólitos essenciais, tais como triglicerídeos, fosfolipídios e ácidos graxos.

Segundo os mesmo autores, os espermatozóides utilizam os triacilgliceróis presentes no plasma seminal, pois sua oxidação serve para satisfazer suas necessidades energéticas. A expressão dos VLDLR na membrana espermática ativa o consumo e a utilização desses lipídios.

Esses receptores estão intimamente ligados a lípase lipoprotéica (LPL) secretada pelas glândulas bulbouretrais e afetam a motilidade espermática de garanhões (CARVER *et al.*, 2002).

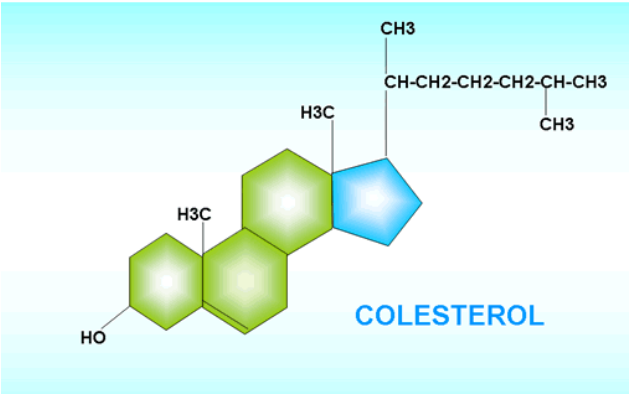
Os espermatozóides após o ciclo de criopreservação sofreram uma redução significativa nos níveis de colesterol, essa observada em correlação ao aumento do número de acrossomo-reagido / células e às alterações nos parâmetros de motilidade (MALDJIANA *et al.*, 2005). Este estudo relatou melhorias significativas em termos de integridade acrossômica, a quantidade e a qualidade da mobilidade de até 2 horas após o descongelamento. Por conseguinte, pode-se argumentar que, em de certa forma, a membrana espermática submetida à criopreservação passa por uma "falsa" reação acrossômica, já que o efluxo de colesterol é similar ao verdadeiro processo que ocorre em contato com fluido do ovócito (CROSS, 1998).

Quando as células espermáticas sofrem uma adição de "gotas ricas em colesterol", tornam-se mais resistentes a sofrer reação acrossômica. Os mesmos autores ainda observaram que com a adição de colesterol em espermatozóides de garanhões antes da criopreservação aumenta a sobrevivência das células criopreservadas. Contudo apenas a perda de colesterol pelos espermatozóides não é suficiente para conferir capacitação, pois essa perda precede outros eventos, como a reação do acrossomo (ZARINTASH e CROSS, 1996).

Segundo os mesmos autores, os espermatozóides que estão no trânsito do trato genital feminino, devido a diluição gradual do sêmen nos fluidos ali presentes, escapam do plasma seminal. Quando essas células reprodutivas foram incubadas com o plasma seminal tiveram um efluxo do colesterol mais rápido do que na ausência do mesmo. Entretanto, a viabilidade e a motilidade dos espermatozóides tratados com plasma seminal não diferiu do grupo controle (sem PS).

Em eqüinos foi relatado que a membrana espermática após a incorporação de colesterol sofreu um aumentou de estabilidade. Espécies que possuem alta concentração de colesterol são menos susceptíveis aos danos causados pelo choque térmico, contudo a capacidade de fertilização do sêmen é diminuída porque altos níveis de colesterol impedem a reação acrossômica, resultados *in vitro* (ZAHN *et al.*, 2002).

**Fig. 2 - Forma estrutural do colesterol**




## 2.3. Fosfolipídios

Os **Fosfolipídios** são "lipídeos polares", componentes estruturais das membranas das células vivas, e também parecem constituir um fator essencial na formação do coágulo sanguíneo. Esse apresenta uma cauda apolar (alquil, radical univalente ou livre) que contêm somente átomos de carbono e de hidrogênio arranjados em uma corrente, dão forma a uma série de homólogos com a fórmula geral CnH2n+1) e de uma cabeça polar, capacita a membrana fazer a conexão entre uma fase polar e outro apolar. Este é um fator determinante para controlar seletivamente a permeabilidade nas membranas das células (WIKIPÉDIA, 2006).

O Plasmologeno é um tipo especial de fosfolipídio encontrado exclusivamente em espermatozóides e outras células com a capacidade de reação rápida a estímulos e são um grupo bastante distinto de fosfotidil lipídios aldeidogênico que contêm um ácido graxo esterificado de glicerol e um éster insaturado com uma longa cadeira de carbono (C-20, C-24), a hidrólise de um plasmologeno produz um aldeído graxo e um ácido graxo (LENZI *et al.*, 1996). Os fosfolipídios são os lipídios mais representativos das membranas das células de espermatozóides e, destes, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina são os principais (MANN, 1964).

No processo reprodutivo, Scott *et al.* (1967) mostrou que os fosfolipídios possuem grande importância como constituintes da membrana celular dos espermatozóides, sendo encontrado em maior quantidade o plasmologeno colina, que representa cerca de 35-40% dos fosfolipídios totais. Hartree e Mann (1961)

identificaram que o plasmologeno colina é o principal fosfolipídio do espermatozóide ejaculado de carneiros, e mostraram que os ácidos graxos provenientes deste são oxidados quando os espermatozóides são lavados. Segundo Hartree e Mann (1959) os fosfolipídios são perdidos após o resfriamento e várias lavagens do sêmen.

A membrana espermática é constituída de uma composição específica de fosfolipídios e uma concentração significativa de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) (LENZI *et al.*, 1996).

A Fosfatidil-Colina é um constituinte principal das membranas celulares, mas esse valor varia de espécie para espécie, como podemos notar na tabela abaixo:

**Tabela. 2 - Composição percentual fosfolipídica da membrana plasmática de espermatozóides de bovinos, ovinos e suínos.**

| LIPÍDIOS | BOVINO (%) | OVINO(%) | SUÍNO(%) |
|---|---|---|---|
| **Fosfatidil-etanolamina** | 9,9 | 11,7 | 27,7 |
| **Fosfatidil-colina** | 50,3 | 56,4 | 39,9 |
| **Esfingomielina** | 12,6 | 13,3 | 23,0 |
| **Fosfatidil-serina** | 1,1 | 3,2 | 3,3 |
| **Fosfoinsositídeos** | 2,7 | 1,6 | 4,0 |
| **Fosfatidil-glicerol** | - | 5,8 | - |
| **Di-fosfatidil-glicerol** | - | 7,8 | - |
| **Colesterol/fosfolipídios** | 0,38 | 0,36 | 0,12 |

FONTE: Snider *et al.* (1975), Parks *et al.* (1985); Parks *et al.* (1987).

Scott *et al.* (1967) notaram que os espermatozóides epididimários e os ejaculados possuem uma diferença significativa entre seus níveis de lecitina, etanolamina e plasmalógeno. Os mesmos autores constataram que os espermatozóides coletados diretamente dos testículos de carneiros possuem 25% de fosfolipídios a mais que os espermatozóides ejaculados e os ácidos graxos extraídos dos fosfolipídios dos espermatozóides testiculares, contem uma grande quantidade de ácido palmítico. O espermatozóide ejaculado contém menos acil-éster e colesterol do que o espermatozóide testicular. A taxa média dos lipídios: fosfolipídios espermáticos foi de 57,5 % e a de plasma seminal 41,7 %. As células espermáticas de coelhos contêm uma maior

quantidade de fosfolipídios (PL), enquanto o plasma seminal, vesículas e gotas representavam 49,8% do total (CASTELLINI *et al.*, 2006).

Sugere-se que as células espermáticas ovinas durante o 12° - 14° dia de passagem pelo epidídimo podem utilizar os fosfolipídios como fonte de energia (SCOTT *et al.*, 1967; SCOTT *et al.*, 1968).

Os espermatozóides possuem uma variação nos níveis de ácido palmítico, que é o ácido graxo encontrado em maior percentual, representa 53% nas células testiculares, já nos ejaculados em torno de 36% dos fosfolipídios dos ácidos graxos totais. O mesmo participa do metabolismo dessas células, sendo o principal precursor do colesterol, tal fato explica a presença duas vezes maior desse esteróide no espermatozóide testicular quando comparado ao ejaculado (SCOTT *et al.*, 1967).

A membrana espermática apresenta uma composição mista de fosfolipídios que pode diferir de espécie para espécie, além da temperatura de transição de fase ser variável para cada tipo de fosfolipídio (BUHR *et al.*, 1994).

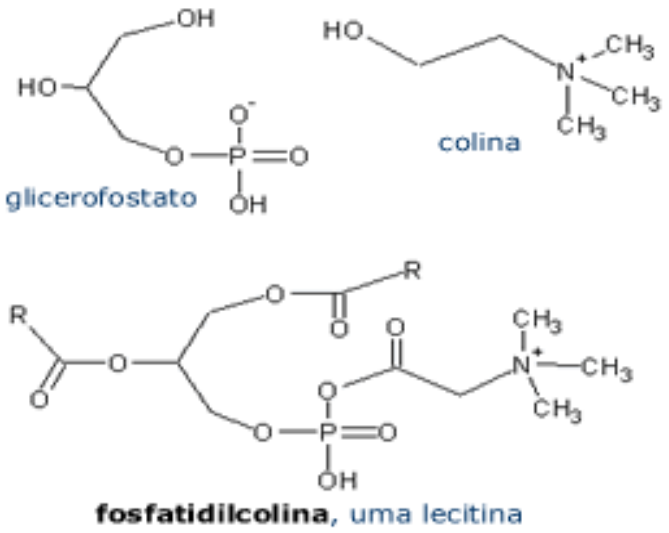
Nos espermatozóides das células do ejaculado quando comparadas as testiculares, possuem uma maior porção de ácidos graxos saturados que insaturados na fração fosfolipídica. Ocorrem diferenciações não somente quantitativas, mas também qualitativas, como a transformação da Fosfatidil Colina (PC) para o Lisofosfatidil Colina (LPC) que foi demonstrado durante a capacitação e reação acrossômica dos espermatozóides de suíno (SNIDER *et al.*, 1975). Este aumento no LPC é provavelmente devido ao efeito das fosfolipases A2 e C, e podem explicar o declínio do PC (BLESBOIS *et al.*, 1999).

A relação entre os níveis de colesterol e fosfolipídios é importantíssima para os eventos de capacitação e reação do acrossomo (DAVIS, 1981). Ainda é proposto um modelo em que ocorre nos espermatozóide uma subida dos níveis de fosfolipídios, induzida pelo bicarbonato, proporcionando o reposicionamento do colesterol, dirigindo-o para a região apical da membrana na superfície de sua cabeça, esse acontecimento permite o efluxo de colesterol mediado pela albumina (FLESCH *et al.*, 2001).

Tanto nos espermatozóides testiculares e ejaculados observa-se uma alta concentração de “cardiolipina” quando comparados com outros tecidos (DAWSON *et al.*, 1962), esse fosfolipídio é um fosfolipídio “duplo” porque possui quatro caudas do ácido graxos, em vez dos dois usuais, é um componente importante da membrana mitocondrial interna, sendo considerado seu principal fosfolipídio, onde constitui aproximadamente 20% do lipídios total. O sêmen de carneiro após ser submetido ao

processo de incubação aeróbica sofre um decréscimo na concentração de todas as classes de fosfolipídios, contudo ”cardiolipina” apresenta um percentual de decréscimo máximo dentre esses lipídeos (SCOTT *et al.*, 1968).

**Fig. 3 – Exemplos de fosfolipídios.**




## 2.4. Proteínas BSP (bovine seminal plasma)

As proteínas BSP-A1/A2 e BSPA3 constituem mais do que 30% do total de proteínas contidas no plasma seminal de touros (MANJUNATH e SAIRAM, 1987). As BSP-Al e BSP-A2 são polipeptídeos de cadeia simples e apresentaram composição idênticas de aminoácidos, contudo estas diferem da BSP-A3, pois as BSP-A1 e BSP-A2 são glicoproteínas e a BSP-A3 não contem nenhum carboidrato covalentemente ligado. A BSP-A1 possui quantidades maiores de carboidrato (3.6-6.5%) do que a BSP-A2 (1.2-2%) e nessa ultima não são encontrados açúcares neutros (MANJUNATH e SAIRAM, 1987).

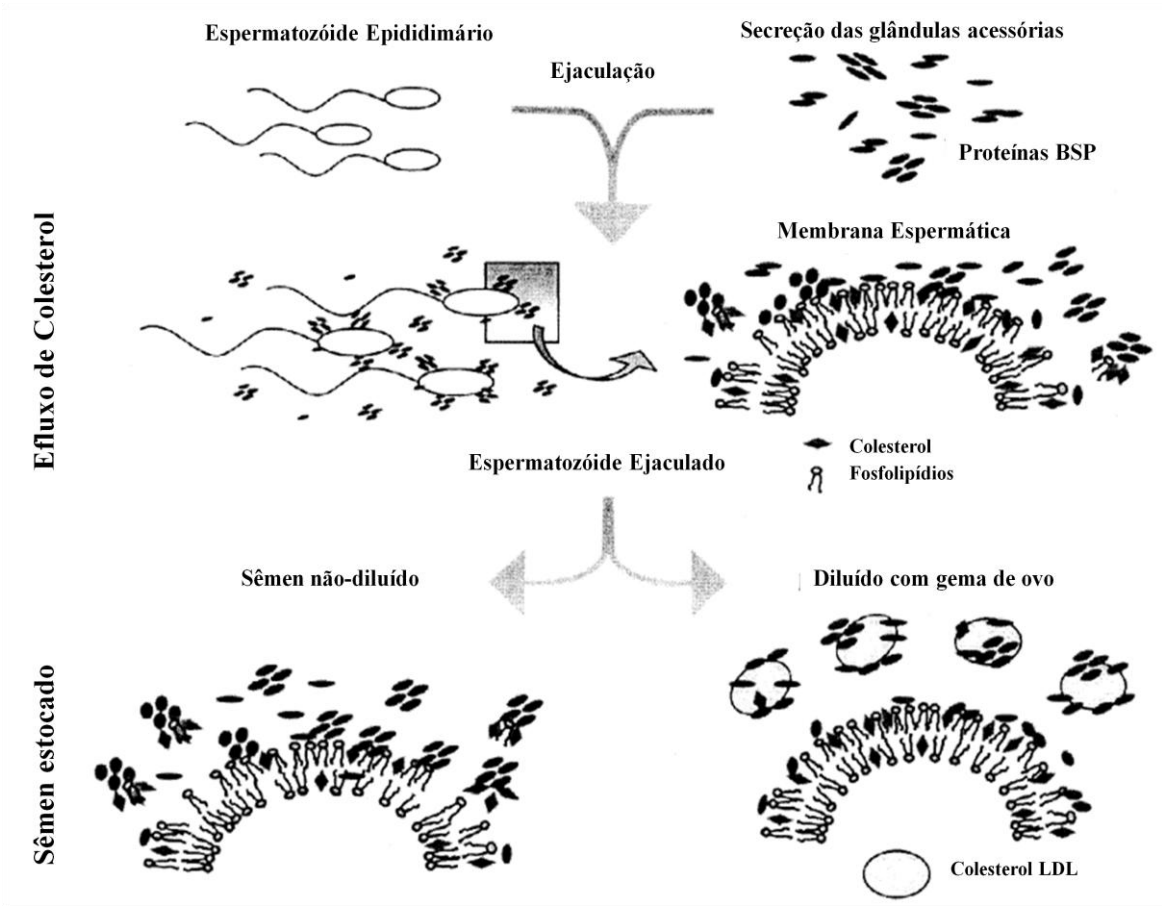
Essas proteínas são secretadas pelas glândulas vesiculares que após a ejaculação se ligam à superfície dos espermatozóides através de sítios de ligação, identificados como fosfatidilcolina, fosfatidilcolina plasmalógeno e esfingomielina, presentes na membrana do espermatozóide (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002). Moreau *et al.* (1999), demonstraram que as proteínas BSP estimularam o efluxo de colesterol dos espermatozóides epididimários, iniciando sua capacitação.

Segundo o mesmo autor as proteínas BSP promovem modificações na membrana lipídica do espermatozóide e interagem com a heparina, que é outro importante fator também envolvido na capacitação do espermatozóide bovino (THÉRIEN *et al.*, 1995), essas proteínas junto com o HDL também estimulam o efluxo de colesterol e de fosfolipídios da membrana espermática (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002). Os espermatozóides sofrem esse efluxo quando entram em contato com o plasma seminal e no aparelho reprodutor feminino (Fig. 4). O efluxo de lipídios pelas proteínas BSP são tempo e concentração dependente (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002). Essas proteínas constituem 60-70% das proteínas no plasma seminal bovino, sendo a BSP A1 e A2 as mais abundantes (THÉRIEN *et al.*, 1998). O mesmo autor ainda observou que os espermatozóides após 8 h de incubação na presença das proteínas BSP tipo A1 e A2 tiveram uma perda de colesterol em torno de 19,1%, já na amostra sem as proteínas diminuíram para somente 5,4%.

O HDL (lipoproteína de alta densidade) sozinho continua estimulando o efluxo de colesterol, mas não conseguiu atingir o nível máximo após 8 h de incubação (32.4 ± 0.6%). A eficiência do HDL promovendo a saída do colesterol e similar a da pré-incubação do espermatozóide com ou sem BSP-A1/-A2. Mesmo assim, os espermatozóides incubados (20 min + 8 h) sofreram um efluxo total de colesterol mais substancial na presença das BSP-A1/-A2 e HDL (51.8 ± 5.0%) do que com o HDL sozinho (39.3 ± 1.2%) (THÉRIEN *et al.*, 1998).

As proteínas BSP ligam-se de forma rápida, específica e saturável ao LDL (Fig. 5) formando complexos (LDL-BSP proteínas) estáveis, essa alta capacidade de ligação com a LDL é importante porque essas retiram as proteínas BSP presentes no sêmen, evitando o efluxo de colesterol e conseqüentemente, a desestabilização da membrana (MANJUNATH *et al.*, 2002) Contudo, quando os espermatozóides são continuamente expostos ao plasma seminal que contém proteínas BSP, essas causam danos na membrana espermática o que pode comprometer o sêmen congelado (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002).

**Fig. 5. Mecanismo proposto para a proteção dos espermatozóides pela gema de ovo (LDL). Ação sobre as proteínas BSP.**




Fonte: MANJUNATH, *et al.* (2002).

Cada BSP isolada é capaz de estimular o efluxo de colesterol do espermatozóide epididimário, com 15-30 minutos de exposição, 7-15% de colesterol foi removido do espermatozóide, com 4 h, cerca de 25% do colesterol foi removido (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002).

Os espermatozóides epididimários expostos a BSP após a incubação com heparina ou HDL mostram grande índice de reação do acrossomo (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002). As proteínas BSP alcançaram altos níveis nos espermatozóides epididimários e foram localizados no acrossomo e na peça intermediária (MANJUNATH *et al.*, 1994).

O plasma seminal tem uma perda mais evidente nos 10–20 minutos iniciais de travessia pelo muco cervical dentro do útero. Nesse momento as proteínas BSP junto com efluxo do esteróide podem induzir a reorganização da membrana. Alem disso, o colesterol, devido à união dessas proteínas com a membrana fosfolipídica, pode ter seus

movimentos livres prevenidos e estabilizados na membrana. Os espermatozóides cobertos pelas proteínas BSP que estão no aparelho reprodutor feminino podem ser capacitados pelo HDL, pois somente quando estão atrelados às BSP os espermatozóides podem sofrem a ação do HDL, e esse pode estimular o segundo efluxo de colesterol. Esse colesterol pode promover a reorganização ou desestabilização da membrana, atividade controlada por sinais desconhecidos. Esse sinal pode ser proveniente dos receptores da zona pelúcida, que iniciariam a reação acrossômica (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002).

Outra interação importante observada em estudos é entre a progesterona e as proteínas BSP. Thérien e Manjunath (2003) observaram que através de incubação de espermatozóides em diferentes tratamentos, a progesterona sozinha não estimula o efluxo de colesterol na membrana espermática e nem a reação do acrossomo, e ainda, não tem efeito significativo mediante as proteínas BSP, pois essas proteínas sozinhas conseguem estimular o efluxo de colesterol. Em concentrações adequadas, as proteínas tipo BSP ligam-se aos fosfolipídios da gema de ovo (MANJUNATH *et al.*, 2002), que é utilizada em diluidores de sêmen, competindo pelo sitio de ação da FLA2 e dessa forma, impedindo sua ação (MANJUNATH *et al.*, 1994).

Nos mesmo estudo notou-se que os espermatozóides perdem sua mobilidade após 6 h de incubação decorrente de uma alta concentração de progesterona (50 mg/ml) que evidenciou-se tóxica para os mesmos. Já essas células incubadas simultaneamente com BSP A1 e A2 e progesterona, tiveram um aumento significativo no percentual de reação do acrossomo (15,3%–16,8%, após 6 h de incubação), comparando com a percentagem obtida na presença somente das proteínas BSP A1 e A2 (em torno de 8,8%, após 6 h de incubação). Após 6 h de incubação, a percentagem de espermatozóides viáveis obtidos na presença de 2 mg/ml de progesterona teve uma pequeno redução, mas foi encontrado uma diferença significativa em comparação ao grupo controle (com lisofosfotidilcolina), tendo melhores resultados nesse ultimo. Já com 10 mg/ml de progesterona, a percentagem de espermatozóides viáveis decresceu de 15.5% (38,5 ± 2.4%, comparado com o controle, 54,0 ± 0,6%).

As proteínas BSP sozinhas estimularam o efluxo de colesterol, sendo importantíssimas para o processo de capacitação, mas essas não estimulam a reação do acrossomo, e a progesterona não está envolvida na capacitação do espermatozóide, mas sim estimulando a reação do acrossomo (THÉRIEN e MANJUNATH, 2003).

# 3. JUSTIFICATIVA

A busca por testes objetivos e práticos que possam predizer a capacidade fecundante de um reprodutor, no contexto da avaliação do sêmen, só será possível a partir de uma melhor compreensão do papel dos constituintes do plasma seminal sobre a fisiologia da célula espermática. Uma vez que, o plasma seminal é uma mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas que apresentam papeis importantes nos mecanismos moleculares regulatórios da função espermática. Além disso, torna-se essencial também o entendimento dos fatores inerentes relacionados ao processo de criopreservação de sêmen.

Dentre os constituintes presentes no ejaculado encontra-se o colesterol, que exerce importantes funções sobre a membrana celular, tais como a regulação da orientação, da fluidez e a da espessura das membranas lipídica (CAMPBELL, 2000). Este esteróide possui também papel chave no processo de capacitação e reação acrossômica (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002), através da perda pelos espermatozóides para meio extracelular, evento denominado de efluxo de colesterol. Em bovinos o colesterol é o principal esteróide livre encontrado no plasma seminal (PARKS *et al.*, 1987), cuja concentração pode variar em função da época do ano (BEER-LJUBIC *et al.*, 2009).

Além disso, no plasma seminal de bovinos estão presentes a família de proteínas específicas denominadas BSPs (Proteínas do plasma seminal) que promovem modificações na membrana lipídica do espermatozóide estimulando o efluxo de colesterol (THÉRIEN *et al.*, 1995). Ainda nesse sentido, essas proteínas interagem com o HDL presente no aparelho reprodutor feminino propiciando o efluxo de colesterol e de fosfolipídios da membrana espermática (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002).

Em caprinos, foram identificadas proteínas homólogas às proteínas da família das BSPs, dos quais foram denominadas GSPs (Proteínas do plasma seminal de caprinos) (VILLEMURE *et al.*, 2003). Entretanto, em clima tropical, pouco se sabe se estas proteínas estão presentes no plasma seminal de caprinos, nem se, as mesmas encontram-se em concentração suficientes para promoverem o efluxo de colesterol da membrana celular para o plasma seminal.

Dessa forma, verificar se existem alterações significativas nas concentrações de colesterol total e HDL no plasma seminal de caprinos logo após a coleta e após

incubação a 38 °C poderá indicar a possível existência das proteínas GSP presentes no plasma seminal. Além disso, não há relatos na literatura sobre a concentração de colesterol total e de HDL no plasma seminal de caprinos criados em clima tropical, bem com, se estes parâmetros possuem associações as características seminais.

# 4. OBJETIVOS

## 4.1. GERAL:

Quantificar os níveis de colesterol total e colesterol HDL presentes no plasma seminal de caprinos, bem como, verificar se ocorre efluxo de colesterol do espermatozóide para o plasma seminal após uma hora de incubação a 38 °C.

## 4.2. ESPECÍFICOS:

- Quantificar os níveis de colesterol total e colesterol HDL, bem como a proporção de HDL em relação ao colesterol total no plasma seminal logo após ejaculação e após uma hora de incubação a 38 °C;
- Verificar se existe correlação entre os níveis de colesterol total e colesterol HDL e os parâmetros de vigor e motilidade;
- Constatar a ocorrência de variação individual para os níveis de colesterol total e a proporção de HDL no plasma seminal de caprinos.

# 5. MATERIAL E MÉTODOS

## *5.1. Local do Experimento*

O experimento foi conduzido no Laboratório de Estudos em Reprodução Animal (LERA) da Universidade Federal do Ceará – UFC, localizado no Campus do Pici, situado a 3°45’ de latitude Sul e 38°32´ de longitude Oeste, com altitude média de 15,5 m acima do nível do mar.

## *5.2. Animais Experimentais*

Foram utilizados oito caprinos Sem Padrão Racial Definido (SPRD) sexualmente maduros, com idade média de 2 anos e alojados em baias individuais, manejados sob condições intensivas e alimentados de acordo com NRC para caprinos (NRC, 1981). A suplementação mineral constituiu da adição de 0,8% de calcário, e 2% de suplemento mineral comercial Caprinofós®, que foi incorporada à ração, sendo a água fornecida *ad libitum.*

A origem dos animais SPRD foi formada provavelmente pelo cruzamento indiscriminado de várias raças nativas e exóticas, todavia não foi possível determinar exatamente a composição genética desses indivíduos.

## *5.3. Coleta de sêmen e procedimento experimental*

Os ejaculados foram coletados semanalmente de oito caprinos SPRD com auxílio de uma vagina artificial, durante oito semanas. Para cada animal, obtiveram-se dois ejaculados com o objetivo de adquirir um maior volume de sêmen. Em seguida, o “pool” de dois ejaculados/animal foi dividido em três alíquotas: i) A primeira alíquota foi imediatamente centrifugada a 3.450 g/ +4 °C/ 20 min. para obtenção do plasma seminal (PS), posteriormente, o PS foi acondicionado em tubos “*eppendorfs”* e mantido sob refrigeração a -18°C até que se realizassem as análises bioquímicas (controle). ii) A segunda alíquota foi incubada em banho-maria a 38 °C, durante uma hora, em seguida, a alíquota foi centrifugada a 3.450 g/ +4 °C/ 20 minutos para obtenção do plasma seminal, e também armazenada a -18 °C (freezer) para posterior análise. iii) A terceira

alíquota foi diluída no diluidor a base de citrato de sódio – glicose (EVANS e MAXWELL, 1990; MATOS-BRITO, 2008), a uma concentração final de $200x10^6$ sptz /mL. Após a diluição, o sêmen foi incubado em banho-maria a 38 ºC para a realização do teste de termoresistência (TTR), por um período de duas horas. Avaliou-se a motilidade, o vigor e a morfologia espermática nos tempos de 5, 60 e 120 minutos após o início da incubação (BARIL *et al.*, 1993). A concentração espermática foi determinada por meio de leitura de espectrofotômetro (HAMMERSTEDT, 1975). A avaliação do vigor foi realizada subjetivamente, baseada numa escala de classificação segundo CORTEEL (1981) onde a pontuação variou de 0–5, sendo zero correspondente à ausência de espermatozóides móveis e cinco à máxima movimentação progressiva, enquanto a motilidade foi realizada conforme preconizado pelo CBRA (1998), de 0 a 100%. Foram confeccionados esfregaços da amostra diluída nos tempos analisados, para verificação da porcentagem de alterações morfológicas. As lâminas foram coradas com azul de bromofenol, onde foram contadas 200 células por meio da microscopia óptica no aumento de 1.000X. As alterações foram classificadas segundo Colas (1980).

### *5.4. Quantificação dos níveis de Colesterol Total e Colesterol HDL.*

A mensuração do colesterol total e colesterol HDL foram realizados no plasma seminal utilizando kits comerciais da marca Labtest Diagnóstico S.A, seguindo as instruções do manual do fabricante. Em resumo, para determinação do colesterol total utilizou-se o kit comercial "colesterol liquiform – Ref.: 76", que consistiu de um sistema enzimático capaz que quantificar o colesterol total presente na amostra. Já para determinação do colesterol HDL a metodologia do kit consistiu na precipitação seletiva das lipoproteínas de baixa e muito baixa densidade (LDL e VLDL), por meio de reação de ponto final, através do kit comercial "Colesterol HDL – Ref.: 13", em seguida, o plasma seminal foi centrifugação, onde o colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL) foi determinado no sobrenadante através do kit comercial "colesterol liquiform – Ref.: 76", por meio de leituras de espectrofotômetro.

Após a quantificação do colesterol total e HDL foi realizado o calculo da proporção de HDL em relação ao colesterol total no plasma seminal.

### *5.5. Análise Estatística*

Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS@ 9.0. O delineamento experimental empregado foi de blocos casualizados, em que cada animal constituiu um bloco para retirar o efeito idade, responsável pela variação entre as alíquotas dos ejaculados, permitindo assim, que todas as outras fontes de variação fossem testadas no mesmo ejaculado proveniente de cada animal. Calcularam-se as médias e desvios-padrão dos parâmetros do colesterol total e HDL seminais, assim como, do vigor, da motilidade e das alterações morfológicas totais (AMT). Foi realizado um estudo de análise de variância para avaliação dos efeitos de incubação e bloco (animal) sobre os parâmetros bioquímicos do PS. Ao serem detectados efeitos significativos pelo teste F, comparou-se às médias pelo teste T, com uma probabilidade de 5% de erro. Um estudo de correlação simples de Pearson foi realizado para testar o grau de associação entre a proporção de colesterol total e HDL e os parâmetros seminais avaliados.

# 6. RESULTADOS

## 6.1. Parâmetros seminais.

Os resultados obtidos quanto ao vigor e a motilidade do sêmen caprino estão expressos na tabela 1. Foram observadas diminuições significativas do vigor e da motilidade entre os tempos de incubação a 38 $^{o}$C. Entretanto, na maioria dos animais ocorreu estabilização dos parâmetros a partir de 60 minutos de incubação. Pouca variação foi observada entre os indivíduos para estes parâmetros.

No estudo atual também foi avaliada a ocorrência de alterações morfológicas totais (AMT) nas células espermáticas ao longo do tempo de incubação. Todavia não foram constatadas diferenças significativas para tais parâmetros (P<0,05).

Tabela 1 – Médias e desvio padrão do vigor e da motilidade do sêmen fresco diluído no citrato – glicose e incubado a 38 $^{o}$C.

| | VIGOR (0-5) | | | MOTILIDADE (%) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Tempo de Incubação (min.) | | | | | |
| ANIMAL | 5 | 60 | 120 | 5 | 60 | 120 |
| 1 | $4,3 \pm 0,3^{aA}$ | $3,3 \pm 0,8^{cB}$ | $2,5 \pm 1,0^{cC}$ | $86,3 \pm 5,2^{aA}$ | $61,9 \pm 13,6^{cB}$ | $53,8 \pm 15,1^{aB}$ |
| 2 | $4,2 \pm 0,5^{aA}$ | $3,3 \pm 0,6^{acB}$ | $2,8 \pm 0,8^{acB}$ | $81,3 \pm 11,3^{aA}$ | $65,0 \pm 13,1^{acB}$ | $53,1 \pm 20,2^{abB}$ |
| 3 | $4,0 \pm 0,7^{aA}$ | $3,1 \pm 1,0^{cB}$ | $2,4 \pm 0,9^{cB}$ | $73,8 \pm 15,1^{aA}$ | $58,8 \pm 18,9^{cA}$ | $39,4 \pm 17,4^{bB}$ |
| 4 | $4,3 \pm 0,4^{aA}$ | $3,37 \pm 0,9^{acB}$ | $2,9 \pm 0,9^{acB}$ | $86,3 \pm 5,2^{aA}$ | $65,0 \pm 13,1,0^{acB}$ | $51,3 \pm 23,6^{abB}$ |
| 5 | $4,1 \pm 0,4^{aA}$ | $3,62 \pm 0,6^{acAB}$ | $3,0 \pm 0,5^{acB}$ | $78,8 \pm 8,3^{aA}$ | $60,0 \pm 18,5^{cB}$ | $56,3 \pm 14,1^{aB}$ |
| 6 | $4,4 \pm 0,2^{aA}$ | $3,94 \pm 0,7^{abA}$ | $3,3 \pm 0,8^{abB}$ | $83,8 \pm 7,4^{aA}$ | $76,3 \pm 7,4^{abB}$ | $62,5 \pm 16,7^{aB}$ |
| 7 | $4,2 \pm 0,5^{aA}$ | $3,31 \pm 0,5^{acB}$ | $2,9 \pm 0,4^{acB}$ | $85,6 \pm 5,0^{aA}$ | $67,5 \pm 10,4^{acB}$ | $58,8 \pm 16,4^{aB}$ |
| 8 | $4,2 \pm 0,5^{aA}$ | $3,62 \pm 0,6^{acA}$ | $2,9 \pm 0,6^{acB}$ | $83,8 \pm 7,4^{aA}$ | $70,0 \pm 14,1^{acA}$ | $56,3 \pm 16,0^{aB}$ |
| Geral | 4.2±0.4 | 3,44 ±0,74 | 2,84 ±0,76 | 82,42 ±9,21 | 65,55 ±14,34 | 53,91 ±17,85 |

Letras minúsculas – comparação entre animais, dentro do mesmo tempo e parâmetro, na mesma coluna.
Letras maiúsculas – comparação entre os tempos, dentro do mesmo parâmetro, na mesma linha.
Diferença significativa (p < 0,05)

## 6.2. Níveis de colesterol total e HDL presentes no plasma seminal na pré e pós-incubação.

As médias e desvios padrão do nível de colesterol total e HDL obtidos antes e após a incubação são apresentados na tabela 2. Os níveis de colesterol total encontrados no plasma seminal de caprinos aumentaram significativamente após a incubação ($p < 0,05$) em 50% dos animais, em geral esse aumento foi de 52,99±13,08 para 62,37±13,84. No que se refere ao colesterol HDL, um aumento significativo não foi constatado entre os animais, ocorrendo apenas em um com exceção do animal 3. Os níveis de colesterol total e HDL variaram significativamente ($p < 0,05$) entre os indivíduos antes e após a incubação a 38 $^{o}$C, em geral esta variação foi de 44,28±12,50 para 48,64±14,80.

Tabela 2 - Média e desvio-padrão dos níveis de colesterol TOTAL e colesterol HDL na pré-incubação ($T_0$) e pós-incubação ($T_1$) no plasma seminal de caprinos.

| ANIMAL | COLESTEROL TOTAL (mg/dl) | | COLESTEROL HDL (mg/dl) | |
|---|---|---|---|---|
| | $T_0$(antes) | $T_1$(após) | $T_0$(antes) | $T_1$(após) |
| 1 | $52,3 \pm 9,3^{bB}$ | $61,8 \pm 10,6^{aA}$ | $49,8 \pm 9,2^{abA}$ | $54,6 \pm 9,2^{abA}$ |
| 2 | $73,6 \pm 7,8^{aB}$ | $77,1 \pm 9,3^{aA}$ | $57,1 \pm 7,6^{aA}$ | $56,6 \pm 7,8^{aA}$ |
| 3 | $41,3 \pm 7,3^{cB}$ | $53,6 \pm 4,4^{acA}$ | $35,5 \pm 6,1^{bB}$ | $43,1 \pm 16,4^{abcA}$ |
| 4 | $53,1 \pm 8,2^{bA}$ | $59,7 \pm 8,5^{abA}$ | $39,9 \pm 2,5^{bA}$ | $41,7 \pm 14,1^{abcA}$ |
| 5 | $49,3 \pm 7,2^{bcB}$ | $60,3 \pm 6,9^{acA}$ | $36,9 \pm 3,1^{bA}$ | $45,7 \pm 9,8^{bcA}$ |
| 6 | $46,5 \pm 4,5^{bcA}$ | $53,2 \pm 12,4^{bcA}$ | $35,1 \pm 9,5^{bA}$ | $40,5 \pm 8,3^{cA}$ |
| 7 | $50,5 \pm 8,3^{bA}$ | $47,5 \pm 8,0^{cA}$ | $40,7 \pm 7,6^{bA}$ | $39,2 \pm 16,8^{cA}$ |
| 8 | $52,0 \pm 7,1^{bA}$ | $52,9 \pm 8,7^{acA}$ | $44,9 \pm 8,9^{bA}$ | $40,8 \pm 12,7^{acA}$ |
| Geral | 52,99±13,08 | 62,37±13,84 | 44,28±12,50 | 48,64±14,80 |

Letras minúsculas – comparação entre animais, dentro de um mesmo tratamento e parâmetro, na mesma coluna.
Letras maiúsculas – comparação entre tratamentos T0 x T1 (pré-incubado e pós-incubado, respectivamente), dentro do mesmo parâmetro, na mesma linha.
Diferença significativa ($p < 0,05$)

### 6.3. Proporção de colesterol HDL/ Total no plasma seminal de caprinos.

A tabela 3 apresenta as médias e desvios padrão da quantidade de colesterol HDL em relação ao colesterol total no plasma seminal antes a após a incubação. A proporção de colesterol HDL no plasma seminal foi elevada, ficando em torno de 83,79 % na pré-incubação e 78,41% na pós-incubação. As proporções de colesterol HDL não diferiram significativamente (P<0,05) antes e após a incubação. Também não foi observada variação individual para este parâmetro.

Tabela 3 - Média e desvio-padrão da proporção de HDL presente em relação ao colesterol total, nos dois tratamentos (T0 e T1).

| ANIMAL | PROPORÇÃO COLESTEROL HDL/ TOTAL (%) | |
|---|---|---|
| | $T_0$ (antes) | $T_1$ (após) |
| 1 | 92,5 ± 8,7[a] | 90,2 ± 8,2[a] |
| 2 | 77,9 ± 16,5 [a] | 74,4 ± 15,6[a] |
| 3 | 86,4 ± 9,4[a] | 79,2 ± 27,3[a] |
| 4 | 76,6 ± 13,0[a] | 70,1 ± 21,0[a] |
| 5 | 76,0 ± 12,4[a] | 75,7 ± 12,2[a] |
| 6 | 75,2 ± 17,0[a] | 77,5 ± 16,3[a] |
| 7 | 81,3 ± 13,8[a] | 80,0 ± 22,7[a] |
| 8 | 86,1 ± 7,9[a] | 78,9 ± 25,7[a] |
| Geral | 83,8% | 78,4%, |

(p > 0,05)

## 6.4. Correlação entre a proporção de colesterol HDL do plasma seminal e os parâmetros seminais.

O estudo das correlações simples de Pearson entre a proporção de colesterol HDL e os parâmetros seminais de vigor, motilidade, número de células normais e as alterações morfológicas totais observaram-se os seguintes resultados. A proporção de HDL e o vigor espermático (r = 0,30) obtiveram uma associação significativamente positiva, porém moderada. A motilidade e a proporção de HDL mostraram-se significativamente correlacionadas, entretanto, essa correlação pode ser considerada pequena (r = 0,19). Para os demais parâmetros observados neste estudo, não foram observadas associações significativas entre as variáveis avaliadas.

Tabela 4 – Correlações simples de Pearson entre os parâmetros de colesterol total, HDL e proporção de colesterol HDL com os parâmetros seminais do sêmen caprino.

| **Parâmetros** | **Vigor** | | **Motilidade** | | **Células Normais** | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **To** | **T1** | **To** | **T1** | **T0** | **T1** |
| Colesterol Total | - 0,13$^{ns}$ | - 0,31** | 0,01$^{ns}$ | - 0,18$^{ns}$ | | |
| Colesterol HDL | 0,10$^{ns}$ | - 0,10$^{ns}$ | 0,04$^{ns}$ | - 0,18$^{ns}$ | | |
| Proporção de colesterol HDL | 0,30** | | 0,20* | | | |

# 8. DISCUSSÃO

## 8.1. Parâmetros seminais

O teste de termorresistência é utilizado rotineiramente por ser um método simples de avaliação do sêmen diluído, sendo, portanto adotado em inúmeros trabalhos de pesquisa (CHEMINEAU *et al*., 1991; BARIL *et al.*, 1993; CAMPOS *et al.*, 2003; SALVADOR *et al*., 2006; YAMASSHIRO *et al*., 2006; AGUIAR *et al*., 2008). No presente estudo, a qualidade espermática do sêmen diluído em citrato de sódio – glicose apresentou reduções significativas durante a incubação por até 120 min em banho-maria a 38 ºC (Tabela 1), porém, constatou-se também que os parâmetros estabilizaram-se com 60 minutos. Este achado explica-se pela alteração da taxa metabólica ocorrido no espermatozóide logo após a incubação a 38 ºC que proporciona perdas de constituintes vitais da célula (BLACKSHAW e SALISBURY, 1957). Por outro lado, há acúmulo de ácido láctico produzido como conseqüência do crescimento bacteriano e da própria atividade metabólica do espermatozóide (MIKI *et al.*, 2004), ocasionando reduções do pH, acidificando o meio, resultando assim, em declínio gradual da atividade metabólica das células espermáticas (CORTEEL, 1974; VISHWANATH e SHANNON, 2000). Nos espermatozóides também há acúmulo de substâncias tóxicas que são resultantes da peroxidação dos lipídios da membrana, no meio de conservação, comprometendo o metabolismo celular (SALAMON e MAXWELL, 2000).

As diferenças entre os animais é o principal indício para a existência de variação individual no ejaculado (FREUND *et al.*, 1959). No presente experimento, a pouca diferença encontrada pode ser atribuída à homogeneidade das amostras experimentais de sêmen, visto que os animais foram previamente selecionados a partir de um grupo maior de animais, em função de alguns constituintes presentes no plasma seminal

(CATUNDA *et al.*, 2009). Além disso, o diluidor citrato-glicose parece eliminar as diferenças existentes entre os ejaculados dos reprodutores (MATOS-BRITO, 2008).

### 8.2. Níveis de colesterol total e HDL presentes no plasma seminal na pré e pós-incubação.

A origem do colesterol nos animais pode ser tanto de origem exógena, proveniente dos alimentos, como endógena, sendo sintetizado a partir do acetil-CoA, no fígado, nas gônadas, no intestino, nas glândulas adrenais e na pele (NELSON e COX, 2005; GONZÁLES e SILVA, 2006). A concentração de colesterol total encontrada logo após a coleta do sêmen de caprinos (52,99±13,08) foi maior do que o observado em bovinos da raça Simental **(**ARGOV *et al.*, 2007; BEER-LJUBIĆ *et al*., 2009) e menor em ovinos das raças Akkaraman e Awassi (GÜNDOGAN, 2006), evidenciando que existem padrões específicos de síntese e secreção de colesterol para cada espécie animal. Segundo Yanagimachi (1994) os diferentes níveis de esteróide celulares entre as espécies parecem estar relacionados com a duração do processo de capacitação espermática. Iborra *et al.* (2000) mostraram que níveis insuficientes de colesterol forem retirado da membrana (cerca de 30%), nenhuma reação acrossômica seria induzido. No entanto, se 40-60% de colesterol foi retirado, uma série de eventos moleculares que levam à reação acrossômica.

O nível de colesterol total após a incubação aumentou significativamente ($P<0,05$). Estes resultados demonstraram que ocorreu efluxo de colesterol da membrana plasmática para o plasma seminal, sugerindo a ação provável das proteínas presente no plasma seminal que possuem afinidade a fosfolipídios contendo colina, denominadas de GSP (Goat Seminal Proteins) que apresentam ação similar às proteínas pertencentes à família das BSPs (Bovine Seminal Proteins), (VILLEMURE *et al.*, 2003). Em bovinos, as proteínas BSPs são capazes de estimular o efluxo de colesterol dos

espermatozóides do ejaculado (THIEREN *et al*., 1998; MOREAU *et al.,* 1999), bem como dos espermatozóides epididimários (MANJUNATH e THÉRIEN, 2002), através da interação com o fosfolipídio colina, resultando na diminuição da proporção entre colesterol:fosfolipídios, um dos requisitos à capacitação espermática.

Além disso, estes achados apóiam a idéia de que estão ocorrendo mudanças moleculares nas células espermáticas quando estes são submetidos a 38 ºC em banho-maria, que pode ser desencadeado provavelmente pelas proteínas do tipo GSP no sêmen de caprinos. Desta forma, trabalhos complementares como foco na identificação dos mecanismos que produzem essas mudanças, poderão prover informações sobre o significado fisiológico subjacente.

Entretanto, tais achados não foram constatados nos ejaculados de todos os animais, demonstrando que existiu uma variação individual do efluxo de colesterol da membrana espermáticas para o plasma seminal, quando os espermatozóides foram submetidos a 38 ºC. Acredita-se, portanto, que devam existir variações na concentração das proteínas do tipo GSP. Outra hipótese, para este achado é que o tempo de incubação para que ocorresse efluxo de colesterol detectável tenha sido insuficiente. Uma vez que, a ação das proteínas BSPs, que são homologas às GSP, depende do tempo e da concentração das mesmas no plasma seminal (THÉRIEN *et al.,* 1998; MANJUNATH e THÉRIEN, 2002).

### 7.1. Proporção de colesterol HDL/ total no plasma seminal de caprinos.

A percentagem de colesterol HDL no plasma seminal de caprinos foi muito elevada neste estudo, atingindo 83,79% antes e 78,41%, após incubação do sêmen a 38 ° C. No entanto, estes dois valores não diferiram estatisticamente. Estudos em touros mostraram que o colesterol do plasma seminal distribuído em duas frações lipoprotéicas (HDL e LDL), obteve a concentração de Colesterol LDL várias vezes maior do que o de

Colesterol HDL (BEER-LJUBIC *et al.*, 2009). No estudo atual, o colesterol LDL não foi medido, mas os resultados sugerem que o colesterol HDL é o principal esteróide encontrado no plasma seminal caprino. O transporte de colesterol HDL para dentro do tecido testicular ou ovariano de rato foi estimado como sendo oito vezes maior do que o transporte de LDL, indicando que nesta espécie a lipoproteína HDL é a principal fonte de colesterol para estes tecidos.

## 7.2. Correlação entre a proporção de HDL e os parâmetros seminais

A obtenção de correlação significativa entre os parâmetros seminais de vigor e motilidade foram relatados em estudos anteriores mostraram a importância desse esteróide na qualidade, não só do espermatozóide, mas do plasma seminal (DAVIS, 1976; JANUSKAUSKAS e RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1995; ARGOV *et al.* 2007; BEER-LJUBIĆ *et al.*, 2009).

O sêmen fresco de caprino de boa qualidade deve apresentar valores entre 70% a 80% de motilidade espermática (CBRA, 1998). Para que tal índice seja alcançado, a composição do plasma seminal deve proporcionar ao espermatozóide proteínas, lipídios, antioxidantes, carboidratos, dentre outras substâncias, que contribuirão de diferentes formas para uma degradação mais lenta dessas células.

Estudo conduzido por Purdy e Graham (2004) mostrou que a adição de colesterol pode diminuir os danos do congelamento, através da inibição da cristalização das cadeias de hidrocarbonetos, reduzindo as injúrias causadas à membrana e fazendo com que os lipídios se mantenham em estado líquido mesmo com a redução da temperatura.

Nesse estudo não foram encontradas associações antes da incubação entre parâmetros seminais e níveis de colesterol total e HDL. No entanto, ambos foram encontradas correlações com vigor ($r = -0,30$, $p < 0,05$) e motilidade ($r = -0,38$; incubação $p < 0,05$) após a 38 ° C para o colesterol total. Alguns estudos relataram a existência de alta concentração de colesterol em amostras de sêmen de alta qualidade (BEER-Ljubic *et al.*, 2009). Mas, como colesterol foi associado com a fração de lipoproteínas do plasma seminal, os autores afirmaram que determinação do colesterol LDL pode servir como um marcador bioquímico adicional da qualidade seminal. Argov et al. (2007) encontrou uma correlação positiva entre colesterol total e qualidade

seminal. No entanto, no estudo atual à maior concentração de colesterol HDL e colesterol LDL não observou essa correlação.

# 8. CONCLUSÃO

O plasma seminal de caprinos contém uma alta concentração de colesterol, sendo o principal colesterol presente o HDL. O sêmen caprino contém fatores que promovem o efluxo de colesterol da membrana celular para o plasma seminal. Foi também constatado a existência de variação individual para o nível de colesterol total.

# 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


AGUIAR, G.V. Efeito individual e da época do ano sobre a composição do plasma seminal e a qualidade do sêmen caprino resfriado a 4ºC por 48 horas no estado do Ceará. **Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia).** Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal da Paraíba e Universidade Rural de Pernambuco. Fortaleza – CE, 2008.

ARGOV, N.; SKLAN, D.; ZERON, Y.; ROTH, Z. Association between seasonal changes in fatty-acid composition, expression of VLDL receptor and bovine sperm quality. **Theriogenology**, v. 67, p. 878–85, 2007.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal Andrology**, v. 21, p. 1–7, 2000.

BARIL, G.; CHEMINEAU, P.; COGNIE, Y.; GUÉRIN, Y.; LEBOEUF, B.; ORGEUR, P.; VALLET, J-C. Manual de formation pour I'insemination artificielle chez les ovins et les caprins. **INRA. Nouzilly**. p.231. 1993.

BEER-LJUBIC´, B.; ALADROVIC´, J.; MARENJAK, T.S.; LAS˘KAJ, R.; MAJIC´-BALIC´, I.; MILINKOVIC´-TUR, S. Cholesterol concentration in seminal plasma as a predictive tool for quality semen evaluation. **Theriogenology**, v.72, p.1132 – 1140, 2009.

BERGERON, A.; CRETE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen`s egg yolk decreses the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biol Reprod.**, v.70, p.708-717, 2004.

BLESBOIS, E.; GRARASSEAU, I.; HERMIER, D. Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2–5ºC. **Theriogenology**, v. 52, p. 325-334. 1999.

BLACKSHAW, A.W.; SALISBURY, G.W. Factors influencing metabolic activity of bull spermatozoa. II. Cold-shock and its prevention. **Journal Dairy Science**, v. 40, p. 1099 – 1106, 1957.

BUHR, M.M. Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. **Cryobiology**, v.31, p.224- 238, 1994.

CAMPBELL, M. K.; Lipídios. In: Campbell, M. K. **Bioquímica**. Ed. Artmed, 3ªEdição. Porto Alegre 2000.

CAMPOS, A. C. N.; NUNES, J. F.; SILVA FILHO, A. H. S.; MONTEIRO, A.W. U. Parâmetros biométricos do trato genital masculino de caprinos sem raça definida (SRD) criados no semi-árido nordestino durante o período seco e chuvoso. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 3, p. 185-189, 2003.

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

CARVER, D.A.; BALL B.A. Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**, v.58, p.1587–95, 2002.

CATUNDA, A.G.V.; CAMPOS, A.C.N.; PEREIRA, J.F.; LIMA, I.C.S.; ARAÚJO, A.A.; MARTINS, G.A. Variação mensal nas concentrações de macroelementos no plasma seminal de caprinos criados em clima tropical úmido. **Ciência animal brasileira**, v.10, n.4, p.1177-1185, out./dez 2009.

CBRA, **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ª ed. Belo Horizonte/MG, v.118, p.6-49, 1998.

CHEMINEAU, P.; CAGNIÉ, Y; GUÉRIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.-C. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. **Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).** FAO Animal Production and Health Paper, Rome, p.222, 1991.

COLAS, G. Variations saisonnieres de la qualité du sperme chez le belier Ile-de-France I. Etude de la morphologie cellulaire et de la motilité massale. **Reproduction Nutrition Development**, v. 20, n. 6, p.1789-1799, 1980.

CORMIER, N.; SIRARD, M.A.; BAILEY, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. J. Androl. v.18, p.461–467, 1997.

CORTEEL, J.M. Viability of goat spermatozoa deep frozen with or without seminal plasma: glucose effect**. Anim Biochem Biophys**, v.14, p.741-745, 1974.

CORTEEL, J.M. Collection, processing and artificial insemination of goat semen. **Nouzilly** – France: INRA, 28p. 1981.

CROSS, N.L. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biol Reprod**, v.59, p.7–11. 1998.

CROSS, N.L. Decrease in order of human sperm lipids during capacitation. **Biol. Reprod**. v.69, p.529–534, 2003.

DARIN-BENNETT A.; WHITE I.G., Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptbility to cold-shock. **Cryobilogy**. v.14, p.466-470. 1977.

DAVIS, J.T.; BRIDGES, R.B.; CONIGLIO, J.G. Changes in Lipid Composition of the Maturing Rat Testis. **Biochem. J**. v.98, p.342. 1966.

DAVIS, B.K. Influence of serum albumin on the fertilizing ability in vitro of rat spermatozoa. **Proc Soc Exp Biol Med**, v.151, p.240-243, 1976

DAVIS, B.K. Interaction the lipids with the plasma membrane of sperm cells. I. The antifertilization action of cholesterol. **Arch Androl**, v.5, p.249-254, 1980.

DAVIS, B.K. Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol/phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. **Proc Natl Acad Sci**. USA, v.78, n.12, p.7560-7564, 1981.

DAWSON, R.M.C.; HEMINGTON, N.; DAVENPORT, J.B. Improvements in the method of determining individual phospholipids in a complex mixture by successive chemical hydrolyses. **Biochem**. J, v.84, p.497-501. 1962.

DEMANIOWICZ W; STRZEZEK J. The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.279-280. 1996.

EHRENWALD, E.; PARKS, J.E.; FOOTE, R.H. Cholesterol efflux from bovine sperm. I. Induction of the acrosome reaction with lysophosphatidyl choline after reducing sperm cholesterol. **Gamete Res**. v.20, p.145–157, 1988.

EHRENWALD, E.; FOOTE, R.H.; PARKS, J.E. Bovine oviductal fluid components and their potential role in sperm cholesterol efflux. **Mol Reprod Dev**, v.25, p.195–204. 1990.

ELIASSON, R. Cholesterol in human semen, **Biochem. J**. v.98, p.242, 1966.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. 4. **Semen y sus características**. Inseminación artificial de ovejas y cabras. Zaragoza: Editorial Acribia, p.25. 1990.

FLESCH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochim Biophys Acta**. v.1469, n.3, p.197-235, Nov 2000.

FLESCH, F.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; NIEVELSTEIN, P.F.E.M.; VERKLEIJ, A.J.; VAN GOLDE, L.M.G.; COLENBRANDER, B.; GADELLA, B.M. Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma membrane. **Journal of Cell Science**. v.114, p.3543-55, 2001.

FONTES, R. Origem, transporte e destino dos lipídios do plasma. Disponível em http://users.med.up.pt/ruifonte/Lipoproteinas_plasmaticas_I.pdf. **Acessado em: 08/07/2007.**

FREUND, M.; MURPHREE, R. L. Influence of sperm concentration, inicial fructose level, and inicial per cent motility on the fructolytic activity of bovine semen. **Journal Dairy Science**, v. 42, n. 8, p. 1320 – 1324, 1959.

GO, K.J.; WOLF, D.P. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. **Biol Reprod**, v.32, p.145-153, Feb 1985.

GONZALEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária.** 2.ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2006.

GUNDOGAN, M. Some reproductive parameters and seminal plasma constituents in relation to season in Akkaraman and Awassi rams. **Turk. J. Vet. Anim. Sci**., v.30, p.95-100, 2006.

HAMMERSTEDT, R.H. Tritium release from [2-3H] D-glucose as a monitor of glucose consumption of bovine sperm. **Biol. Reprod**. 12, 545–551, 1975.

HAFEZ, E. S. E. Fertilização e clivagem. In: Hafez, E. S. E. **Fisiologia da Reprodução**. Ed. Manole, 7ª ed. São Paulo 2004.

HARTREE, E.F.; MANN, T. Plasmalogen in ram semen, and its role in sperm metabolism. **Biochem. J**. v.71, n.3, p.423-434, Marc 1959.

HARTREE, E.F.; MANN, T. Phospholipids in ram semen: metabolism of plasmalogen and fatty acids, **Biochem. J**. v.80, p.464-476, 1961.

HOFFMANN, B.; LANDECK, A. Testicular endocrine function, seasonality and semen quality of the stallion. **Anim Reprod Sci**. v.57, p.89–98, 1999.

IBORRA, A.; COMPANYÓ, M.; MARTINEZ, P.; MORROS, A. Cholesterol efflux promotes acrossome reaction in goat spermatozoa. **Biol Reprod**, v.62, p.378-383, 2000.

JANUSKAUSKAS, A., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. **Acta Vet.Scand**., v. 36, p. 571-4, 1995.

KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A.; KATHIRAVAN, P. Capacitation status of fresh and frozen-thawed buffalo spermatozoa in relation to cholesterol level, membrane fluidity and intracellular calcium. **Animal Reproduction Science**. v.116, p.244–253, 2009.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINIL, L.; DONDEROL, 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.

MALDJIANA, A.; PIZZI, F.; GLIOZZIC, T.; CEROLINIB, S.; PENNY, P.; NOBLE, R. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar sêmen. **Theriogenology**. v.63, p.411-421, 2005.

MANJUNATH, P.; SAIRAM, M. R. Purification and biochemical characterization of three major acidic proteins (BSP-A1, BSP-A2 and BSP-A3) from bovine seminal plasma, **Biochem. J.** v.241, p.685-692, 1987.

MANJUMATH, P.; MARCEL, Y.L.; UMA, J.; SEIDAH, N.G.; CHRETIEN, M.; CHAPDELAINE, A. Apolipoprotein A-I Binds to a Family of Bovine Seminal Plasma

Protein. **The Journal of Biological Chemistry**. v.264,n.28, p. 16853-16857, October 1989.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biol Reprod**. v.50, n.4, p.977, Apr 1994.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation., **J. Reprod Immun**. v.53, p.109-119, April 2002.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major Proteins of Bovine Seminal Plasma Bind to the Low-Density Lipoprotein Fraction of Hen's Egg Yolk. **Biol Reprod**. v.67, p.1250 – 1258, Oct 2002.

MANN, T. The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. **Methuen**. p. 493. London 1964.

MOREAU, R.; FRANK, P.G.; PERREAULT, C.; MARCEL, Y.L.; MANJUNATH, P. Seminal plasma choline phospholipid-binding proteins stimulate cellular cholesterol and phospholipid efflux. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1438, p.38-46, Fev 1999.

MATOS BRITO, B. G. Viabilidade do sêmen caprino conservado em três diferentes diluidores: Efeito da concentração inicial de frutose no plasma seminal. **Dissertação (Mestrado em Zootecnia).** Universidade Federal do Ceará. Fortaleza – CE, 2008.

MAXWELL,W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. Anim. **Reprod. Sci**. v.42, p.55–65, 1996.

MIKI K.; QU W.; GOULDING E.H.; WILLIS W.D.; BUNCH D.O.; STRADER L.F.; PERREAULT S.D.; EDDY E.M.; O'BRIEN D.A. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility. **Proc Natl Acad Sci.** v.101, p.16501–16506. U S A. 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, Fourth Edition (Hardcover) Chapter 21: Lipid Biosynthesis. p.1119. 4 ed, 2005.

NUTRIENT REQUIREMENTS OF GOATS - NRC. Washington,D.C.: **National Academy Press**, 1981. 91p.

PARKS, J.E.; HAMMERSTEDT, R.H. Developmental Changes Occurring in the Lipids of Ram Epididymal Spermatozoa Plasma Membrane. **Biol. of Reprod**. v.32, p.653-668, 1985.

PARKS J.E.; ARION J.W.; FOOTE R.H. Lipids of plasma membrane and outer acrosomal membrane from bovine spermatozoa. **Biol. Reprod**. v.37, p.1249–1258, Dec 1987.

PERES, G.V. Criopreservação de sêmen ovino (Revisão de literatura). **Curso de medicina veterinária (Trabalho de conclusão de curso)**. Poços de caldas - MG, 2006.

PURDY, P.H.; GRAHAM, J.K. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. **Cryobiology**., v.48, p.36-45, 2004.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77 – 111, 2000.

SALVADOR, I.; YÁNIZ, J.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P.; GÓMEZ, E.A.; SILVESTRE, M.A. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5ºC. **Theriogenology**. v.66, p.974–981, 2006.

SANO, M. Phosphatides in the fish sperm. **J. Biochem**. v. 1, p. 1–25. 1922.

SCOTT, T.W.; VOGLMAYR, J.K.; SETCHELL B.P. Lipid composition and metabolism in testicular and ejaculated ram spermatozoa, **Biochem. J**. v.102, p.456-461, 1967.

SCOTT, T.W.; DAWSON, R.M.C. Metabolism of phospholipids by spermatozoa and seminal plasma. **Biochem. J**. v.108, p.457-463, Feb 1968.

SNIDER, D. R.; CLEGG, E. D. Alteration of phospholipids in porcine spermatozoa during in vivo uterus and oviduct incubation. **J Anim Sci**. v.40, p.269–74. 1975.

SWENSON, M.J.; REECE, W.O. Dukes, **Fisiologia dos Animais Domésticos**. 11.ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1996.

THÉRIEN, I.;G BLEAU, P; MANJUNATH, P. Phosphatidylcholine-binding proteins of bovine seminal plasma modulate capacitation of spermatozoa by heparin. **Biol Reprod**. v.52, p.1372-1379, Jun 1995.

THÉRIEN, I.; MOREAU, R.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. **Biol Reprod**. v.59, p.768–776, 1998.

THÉRIEN, I.; MANJUNATH, P. Effect of progesterone on bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Biol Reprod**. v.69, p.1408-1415, Jun 2003.

VASQUEZ, J.M.; ROLDAN, E.R.S. Phospholipid metabolism in boar spermatozoa and role of diacylglycerol species in the de novo formation of phosphatidylcholine. **Mol Reprod**. v.47, p.105–12. Dec 1997.

VILLEMURE, M.; LAZURE, C.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of gelatin-binding proteins from goat seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 39-48, 2003.

VISCONTI, P. E.; GALANTINO-HOMER, H.; NING, X. P.; MOORE, G. D.; VALENZUELA, J. P.; JORGEZ, C. J.; ALVAREZ, J. G.; KOPF, G. S. Cholesterol efflux-mediated signal transduction in mammalian sperm – betacyclodextrins initiate transmembrane signaling leading to an increase in protein tyrosine phosphorylation and capacitation. **J. Biol. Chem**. v.274, p.3235-42, 1999.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 23-53, 2000.

WIKIPÉDIA. A Enciclopédia Livre. Disponível em http://pt.wikipedia.org/wiki/htm. **Acessado em: 15/07/2007**.

WILHELM, K. M.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES E. L. Effects of Phosphatidylserine and Cholesterol Liposomes on the Viability, Motility, and Acrosomal Integrity of Stallion Spermatozoa Prior to and after Cryopreservation. **Cryobiology**. v.33, n.32, p.320–329, 1996.

WOLF, D.E.; HAGOPIAN, S.S.; LEWIS, G.L.; VOGLMAYR, J.K.; FAIRBANKS, G. Lateral Regionalization and Diffusion of a Maturation-dependent Antigen in the Ram Sperm Plasma Membrane. **J. Cell Biology**. v.102, p.1826-1831, May 1986.

YAMASSHIRO, H.; KUMAMOTO, K. WANG, H.; TAMASHITA, Y.; TERADA, T. Effect of sêmen colletion in extender solution on the characteristics of goat spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 52, n. 3, p.397 – 406, 2006.

YANAGIMACHI, R. **The Physiology of Reproduction**. In: E. Knobil, J.D. Neill. Ed. Raven Press. p. 189-317. New York, 1994.

ZARINTASH, R.J.; CROSS, N.L. Unesterified cholesterol content of human sperm regulates the response of the acrosome to the agonist, progesterone. **Biol Reprod**. v.55, p.19-24, Jul 1996.

ZAHN, F.S. PAPA, F.O., DELL'AQUA JR., J.A. Cholesterol incorporation on equine sperm membrane: effects on post-thaw sperm parameters and fetility. **Theriogenology**. v.58, p.237-240, 2002.

# Livros Grátis

( http://www.livrosgratis.com.br )

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo