

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CORRELAÇÃO ENTRE O PERFIL LIPÍDICO DO SÊMEN DE
GARANHÕES E A QUALIDADE ESPERMÁTICA PÓS-
DESCONGELAÇÃO**

TATIANA CABRERA

Botucatu – SP
Janeiro/2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**CORRELAÇÃO ENTRE O PERFIL LIPÍDICO DO SÊMEN DE
GARANHÕES E A QUALIDADE ESPERMÁTICA PÓS-
DESCONGELAÇÃO**

TATIANA CABRERA

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia,
Campus de Botucatu, como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor no Programa de Pós-graduação
em Biotecnologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Ferreira
de Souza

Botucatu – SP
Janeiro/2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cabrera, Tatiana.

Correlação entre o perfil lipídico do sêmen de
garanhões e a qualidade espermática pós-descongelação /
Tatiana Cabrera. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Fabiana Ferreira de Souza

Capes: 50504002

1. Equino - Reprodução. 2. Criopreservação. 3.
Preservação do sêmen. 4. Lipídios. 5. Espermatozóides. 6.
Biotecnologia animal.

Palavras-chave: Criopreservação; Equino; Espermatozoide;
Lipídios.

Nome do autor: Tatiana Cabrera

Título: Correlação do perfil lipídico do sêmen de garanhões e os parâmetros espermáticos pós-descongelação

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária FMVZ- UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Gabriel Augusto Monteiro

Membro

Departamento de Reprodução Animal

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Marcio Teoro do Carmo

Membro

Central de Reprodução Lub Breeding

Dra. Camila Paula de Freitas Dell`aqua

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - UNESP- Botucatu

Prof. Dra. Priscilla Nascimento Guasti

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - UNESP- Botucatu

Data da Defesa: 23 de Janeiro de 2017.

DEDICATÓRIA

À Deus....

Pela vida e pela realização de mais uma etapa em minha vida

À minha filha....

Por ser a pessoa mais importante da minha vida e me proporcionar tanta felicidade

Ao meu marido....

Pela paciência e companheirismo

À minha mãe Tereza...

Pelo amor incondicional, coragem e força

Aos meus irmãos Júnior e Fernando...

Pelo apoio e carinho

Ao meu tio Cláudio...

Pelas oportunidades na minha carreira profissional

Aos cavalos...

A quem dedico todo o meu aprendizado

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo Carlos Ramires Neto, pela enorme colaboração durante todo o experimento. Sua ajuda foi essencial para a realização deste trabalho. Muito obrigada Carlinhos!

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga pela oportunidade e por todos os ensinamentos profissionais transmitidos desde o Mestrado.

À Prof. Dra. Fabiana Ferreira de Souza, pela orientação, dedicação e ensinamentos. Te agradeço por ter sido tão atenciosa e por toda a ajuda na realização do meu doutorado!

À Dra. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua pela disponibilidade e enorme ajuda na estatística, na qualificação e finalização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua pela participação e contribuição na minha banca de qualificação.

À Dra. Thaís Regiani Cataldi pela atenção e auxílio prestados nos esclarecimentos das análises de MALDI- TOF MS.

À banca examinadora: Professor Dr. Gabriel Augusto Monteiro, Dr. Marcio Teoro do Carmo, Dra. Camila Paula de Freitas Dell'Aqua e à Professora Priscilla Nascimento Guasti.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista- UNESP- Botucatu pela oportunidade de realizar o curso.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e a todos os colegas da pós graduação Yamê, Mariana, Paty, Alexandre, pelo convívio e colaboração.

À todos que diretamente ou indiretamente colaboraram para a execução deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATÖES

<i>BAD FREEZER</i>	Animais sensíveis à congelação
CASA	Análise computadorizada do movimento espermático
CI	Célula íntegra
<i>GOOD FREEZER</i>	Animais resistentes à congelação
IP	Iodeto de propídio
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
mL	Mililitro
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
<i>m/z</i>	Massa carga
OAHA	Ácido graxo hidroxi ω -o-acil
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados
PERO	Índice de peroxidação lipídica
RAP	Porcentagem de espermatozoides rápidos
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SM	Esfingomielina
VAP	Velocidade média de trajeto
VSL	Velocidade linear progressiva
VCL	Velocidade curvilínear progressiva
WOB	Coeficiente de oscilação
v/v	Volume por volume
μ L	Microlitro
μ m/s	Micrômetro por segundo
ω	Ômega
°C	Graus Celsius

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

	Pág.
Table 1. Setup parameters used in CASA system analysis.....	26
Table 2. Descriptive parameters of fresh and thawed sperm from stallions.....	29
Table 3. Major ions identified in matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in relation to the mass (m/z), lipid subclass and reference of the ion identification.....	31
Table 4. Correlation between relative abundance of lipid ions and parameters of fresh and thawed sperm. Pearson coefficient (r) and P value.....	35

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

	Pág.
Fig. 1. Box plot of fresh sperm kinetics and membrane integrity from stallions of Bad and Good groups. TM: total motility (%); PM: progressive motility (%); VAP: path velocity ($\mu\text{m/s}$); VSL: linear velocity ($\mu\text{m/s}$); VCL: curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$); WOB: oscillation coefficient (%); RAP: rapid sperm percentage (%); CI: integral cells (%)......	29
Fig. 2. Box plot of thawed sperm kinetics and membrane integrity from stallions of Bad and Good groups. TM: total motility (%); PM: progressive motility (%); VAP: path velocity ($\mu\text{m/s}$); VSL: linear velocity ($\mu\text{m/s}$); VCL: curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$); WOB: oscillation coefficient (%); RAP: rapid sperm percentage (%); CI: integral cells (%); PEROX: lipid peroxidation (%)......	30
Fig. 3. Phospholipid representative mass spectra of semen from one stallion analyzed by MALDI-TOF MS.....	32
Fig. 4. Box plots and density plot points before (A) and after normalization (B) of the variables submitted to lipidomic analysis, in the Bad and Good groups. Sample median, row-wise and log normalization.....	32
Fig. 5. Score plot of the multivariate analysis of the principal components analysis (PCA) PC1 and PC2 in the Bad and Good groups, which indicates the stallions that represent the variation between the groups (PC1 + PC2 = 57.7%)......	33

Fig. 6. Fold-change ions (m/z) comparing the absolute values of the mean changes in the Bad and Good groups, which were more (above the dotted line) or less (below the dotted line) abundant (pink circles)..... 33

Fig. 7. Results of multivariate regression of type partial least squares - discriminant analysis (PLS-DA). The color boxes (right) indicate ion relative abundance in each group (Bad and Good)..... 34

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 A célula espermática.....	2
2.2 Composição lipídica da membrana espermática	3
2.3 Composição lipídica do plasma seminal	6
2.4 Princípios da criopreservação.....	7
2.5 Efeitos da criopreservação sobre a qualidade seminal.....	9
3. HIPÓTESE	10
4. OBJETIVO	10
5. REFERÊNCIAS.....	11

CAPÍTULO 2

ABSTRACT	22
1. Introduction	23
2. Material and methods.....	24
Ethical aspects.....	24
Animals and groups	24
Semen collection and processing	24
Sperm kinetics	25
Flow cytometry.....	25
Lipidomic analysis.....	27
Statistical analysis.....	27
3. Results	28
4. Discussion.....	35
References.....	39

CAPÍTULO 3

Conclusões gerais.....	48
Anexos.....	48

RESUMO

CABRERA, T. **CORRELAÇÃO ENTRE O PERFIL LIPÍDICO DO SÊMEN DE GARANHÕES E A QUALIDADE ESPERMÁTICA PÓS-DESCONGELAÇÃO.** Botucatu-SP, 2017. 48p. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

A membrana espermática é caracterizada por uma significativa quantidade de lipídios relacionados com funções específicas da célula, tais como fusogenicidade e permeabilidade, necessárias para o espermatozoide alcançar e fundir-se ao oócito. O perfil lipídico dos espermatozoides difere entre as espécies e indivíduos da mesma espécie, o que pode conferir maior ou menor manutenção da integridade plasmática e crioresistência, uma vez que a exposição desta célula a baixas temperaturas modifica a composição e a organização lipídica da membrana, diminuindo a longevidade e consequentemente sua capacidade fecundante. A presença e a quantidade de lipídios específicos, como as fosfatidilcolinas, esfingomielinas, seminolipídios, plasmalogênios e ácidos graxos com diferentes graus de saturação, além do colesterol exercem importantes funções associadas aos processos de capacitação, motilidade, viabilidade e preservação da integridade da membrana espermática. Assim, um maior estudo sobre a composição lipídica do sêmen e a influência destas macromoléculas sobre a qualidade espermática após a criopreservação possibilitará desenvolver novas estratégias para tornar a célula espermática mais resistente frente ao processo de criopreservação.

Palavras chave: criopreservação, equino, lipídios, espermatozoide.

ABSTRACT

CABRERA, T. CORRELATION BETWEEN THE LIPID PROFILE OF THE SEMEN FROM STALLIONS AND POST-THAWING SPERM QUALITY.

Botucatu, 2017 48p, Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

The sperm membrane is characterized by a significant amount of lipids related to specific functions such as fusogenicity and permeability required for the sperm to reach and fuse to the oocyte and whose lipid profile differs between species and individuals of the same species. Studies have shown that this lipid composition is directly associated with the maintenance of the plasma integrity and the spermatozoa resistance to freezing since the exposure of this cell to this process modifies the lipid composition and organization of the membrane, thereby reducing longevity and, consequently, the fertilizing capacity of the sperm cell. The presence and quantity of specific lipids, such as phosphatidylcholines, sphingomyelins, seminolipids, plasmalogens and fatty acids with different degrees of saturation, besides cholesterol exert important functions associated to the capacitation, motility, viability and preservation processes of sperm membrane integrity. Thus, a larger study on lipid composition of the semen and its influence on the quality of frozen semen would allow us to find new strategies to improve the resistance of the sperm cell to the cryopreservation process.

Keywords: cryopreservation, equine, lipids, spermatozoa.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen é uma das biotecnologias mais aplicadas na equinocultura, uma vez que possibilita o transporte do sêmen a longas distâncias, permite o armazenamento de material genético por períodos indeterminados e diminui os riscos de disseminação de doenças. Apesar disso, a taxa de fertilidade, com a utilização de espermatozoides criopreservados, possui uma considerável variação individual e é significativamente inferior quando comparada ao uso do sêmen fresco (WATSON, 2000; ALVARENGA et al., 2005; LOOMIS; GRAHAM, 2008).

Segundo Garcia et al. (2011) o conteúdo de fosfolípidios da membrana espermática deve ser considerado como importante fator, responsável pela qualidade do sêmen, particularmente em relação à congelação. Os principais lipídios da membrana plasmática são os fosfolípidios, os quais compõem a estrutura da célula e atuam na fluidez, permeabilidade e funcionamento às mudanças térmicas (EDIDIN, 2003).

Ao contrário de outros tipos celulares, a membrana do espermatozoide é caracterizada por uma fração significativa de fosfolípidios com ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), com funções específicas, necessárias para a célula espermática alcançar e fundir-se ao oócito (LADHA, 1998; WASSALL; STILWELL, 2009). Entretanto, o alto conteúdo celular de PUFAs tem sido apontado como responsável pela susceptibilidade da membrana plasmática aos danos peroxidativos decorrentes da criopreservação (FERRUSOLA et al., 2009; ALVAREZ; STOREY, 2008; AITKEN et al., 2009).

Estudos demonstram a proporção de determinados lipídios estão relacionados com subfertilidade inexplicada (BRINSKO et al., 2007; SUGKRAROEK et al., 1991) baixa qualidade do sêmen criopreservado (GARCIA et al., 2010).

Assim, a variabilidade nas taxas de fertilidade após a criopreservação pode estar associada ao perfil lipídico da membrana espermática, que difere entre as espécies e entre os indivíduos da mesma espécie (POULOS; DARIN-BENNET; WHITE, 1973; WHITE, 1993; SWAIN; MILLER, 2000; MILLER et al., 2005; WATERHOUSE et al., 2006; MELLVILLE; JOHNSTON; MILLER, 2012).

Em vista disso, o estudo da composição lipídica da membrana espermática possibilitaria a caracterização da qualidade seminal e sua futura utilização como biomarcador de fertilidade. Outras abordagens como a suplementação de componentes lipídicos a meios extensores de sêmen ou à alimentação, poderiam aumentar a eficiência reprodutiva não somente de equinos, como também de outras espécies frente aos processos da criopreservação de sêmen.

Desta maneira, o presente estudo tem como objetivo correlacionar o perfil lipídico do sêmen de garanhões com a qualidade espermática pós-descongelação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A célula espermática

O espermatozoide é uma célula haplóide, altamente diferenciada e cuja estrutura consiste da cabeça, com um grande núcleo altamente condensado e do acrossomo (FLESCHE; GADELLA, 2000). O flagelo é responsável pela motilidade da célula espermática e as mitocôndrias localizadas na peça intermediária geram energia para mover o axonema (GARNER; HAFEZ, 2004).

O acrossomo recobre, externamente, dois terços da cabeça espermática e possui enzimas importantes para que ocorra a penetração do material genético masculino no oócito (GUYTON; HALL, 1997). A célula espermática fica inteiramente envolta por uma membrana plasmática, conhecida como plasmalema, que consiste em uma estrutura fina, flexível e autosselante (GUYTON; HALL, 1997) com diferentes concentrações e distribuições de partículas intra-membranas (FLESCHE; GADELLA, 2000). Esta estrutura possui permeabilidade seletiva, mantendo assim as diferenças de composição entre o interior e exterior da célula (SQUIRES et al., 1999)

A membrana plasmática é constituída por uma bicamada lipídica contendo moléculas de fosfolípidios polares, cuja porção hidrofóbica está direcionada para o centro da membrana e a porção hidrofílica para a superfície da membrana; por proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolipídios (SINGER; NICOLSON, 1972)

A membrana plasmática apresenta-se na forma de um mosaico fluido, pelo fato de que as moléculas de proteínas movem-se livremente entre os fosfolipídios bilaterais (GADELLA et al., 2001). As proteínas periféricas não interagem por ligações eletrostáticas ou pontes de hidrogênio com outras proteínas periféricas, proteínas integrais ou com a porção polar dos fosfolipídios (MURRAY et al., 1994).

A movimentação livre e as interações entre os lipídios e as proteínas da membrana plasmática são dependentes da manutenção da fluidez e constituem a base para ordenar os domínios da membrana garantindo assim a funcionalidade da célula espermática (HAMMERSTEDT et al., 1990; FLESCHE; GADELLA, 2000; PARKS; GRAHAM, 1992).

Os fatores que afetam a fluidez da membrana correspondem a composição relativa entre fosfolipídios e colesterol, como também a temperatura a qual a membrana é exposta (HAMMERSTEDT et al., 1990). Estas características estruturais especializadas do espermatozoide têm como função assegurar a liberação do material genético contido em seu núcleo para o oócito, cuja união produzirá o zigoto (EDDY; O'BRIEN, 1994).

2.2 Composição lipídica da membrana espermática

Os lipídios possuem importantes funções celulares como reserva de energia e combustível celular, alterações estruturais e funcionais da membrana e efeito na interação célula-célula. São macromoléculas classificadas de acordo com seus componentes estruturais, como os glicerídeos, esteróides, fosfolipídios, ácidos graxos, lipoproteínas e glicolipídios (STUBBS; SMITH, 1984).

Os fosfolipídios representam aproximadamente 57% dos lipídeos da membrana espermática e variam de acordo com a espécie. Em equinos, os fosfolipídios correspondem a 23,2% de fosfatidilcolina, 8% de fosfatidiletanolamina, 7,5% de fosfatidilserina, 6,4% de esfingomiélin, 6,2% de seminolipídio, 2,5% de fosfatidilglicerol e 1,5% de fosfatidilinositol (GADELLA et al., 2001). Também estão presentes significantes níveis de gliceróis neutros, como diacilgliceróis e acilcarnitinas; além de altos níveis de sulfato de colesterol (WOOD et al., 2016)

Os fosfolipídios da membrana plasmática ficam dispostos de modo que as caudas hidrofóbicas interajam para criar um interior hidrofóbico e uma barreira permeável (BERG et al., 2002). As caudas são constituídas por cadeias de ácidos graxos com ligações simples (saturadas) ou duplas (insaturadas), cuja saturação está relacionada à capacidade de agregação dos fosfolipídios e fluidez da membrana (SIQUEIRA, 2004).

Os ácidos graxos da série ômega 3 (ω 3) predominam nos fosfolipídios das membranas espermáticas de várias espécies, regulando sua permeabilidade e flexibilidade (SIRRI et al., 1995). Em bovinos, o ácido docosa-hexanóico (22:6 ω 3) corresponde ao principal ácido graxo (PARKS; LYNCH, 1992) e em humanos, constitui de 20 a 40% do total de ácidos graxos, com significativa variação individual (MANN; LUTWAK- MANN, 1981; LIN et al., 1993; ZALATA et al., 1998). Já em aves, predominam os ácidos araquidônico (20:4 ω 6) e docosatetraenóico (C22:4 ω 6) (RAVIE; LAKE, 1985; HOWARTH et al., 1977; KELSO et al., 1996).

Em equinos e suínos o ácido graxo predominante é o pentanóico (22:5 ω 3), quando comparado ao docosa-hexaenóico (PARKS; LYNCH, 1992; GARCÍA et al., 2011). Apesar disso, outro estudo encontrou resultados contraditórios, demonstrando uma maior abundância do ácido docosa-hexaenóico em relação ao ácido pentanóico nos glicerofosfolipídios dos espermatozoides de garanhões, sugerindo seu papel na remodelação desses lipídios (WOOD et al., 2016).

Outro ácido graxo identificado no espermatozoide equino é o ácido graxo ω -hidroxi (o-acil) (OAHFA), composto por cadeias extremamente longas com formas isobáricas e de origem testicular (WOOD et al., 2016). Sua estrutura está também presente em glândulas sebáceas das pálpebras e é sintetizada pela *elongation of very long-chain fatty acid-4* (ELOVL4), uma enzima necessária para a síntese de lipídios contendo ácidos graxos com cadeias de carbono muito longas e que, possivelmente está associada às propriedades surfactantes (McMAHON et al., 2014).

Os espermatozoides são as únicas células entre os mamíferos que contém altos níveis de plasmalogênios (revisado por GORGAS et al., 2006; LESSIG et al., 2004), os quais são lipídios caracterizados por possuírem ligação

éter ao invés de ligação éster no carbono 1 ou carbono 2 da molécula de glicerol. Os plasmalogênios representam em torno de 25% dos fosfolipídios da membrana espermática de garanhões (GARCIA et al., 2010). Em suínos e humanos também foram descritos níveis consideráveis desta classe lipídica (LESSIG et al., 2004).

Os plasmalogênios geralmente estão combinados com ácidos graxos poli-insaturados, principalmente docosa-hexanóico (C22:6 ω 3) e docosapentanóico (NAGAN; ZOELLER, 2001; GARCIA et al., 2011) sendo representados principalmente pelas colinas, etanolaminas e seminolipídios (ATTAR et al., 2000; UENO et al., 1977; WHITE et al., 2000; WOOD et al., 2016), os quais possuem propriedades antioxidantes (revisado por GORGAS et al., 2006).

A composição dos ácidos graxos da membrana também está relacionada às características espermáticas como motilidade, concentração, morfologia e viabilidade espermática (AKSOY et al., 2006). Em peixes, a composição dos ácidos graxos varia em diferentes regiões da membrana espermática, havendo maior concentração de PUFA's na cauda em relação à região da cabeça, sugerindo uma relação com a fluidez necessária para a motilidade. Já os ácidos graxos da cabeça se relacionariam à preservação da integridade da membrana espermática (BEIRÃO et al., 2012).

Estudos demonstram que em mamíferos os seminolipídios, glicolipídios presentes no folheto externo da membrana plasmática do espermatozoide têm um papel fundamental na fertilização, já que controlam a interação entre a célula espermática e a zona pelúcida do oócito (WHITE et al., 2000; HONKE et al., 2002). Em espermatozoides recém ejaculados, estes glicolipídios migram da superfície apical da cabeça do espermatozoide para o subdomínio equatorial da membrana. Um evento similar de migração dos seminolipídios também ocorre após armazenamento prolongado do sêmen, embora mais lentamente (GADELLA et al., 1994).

De acordo com Attar et al. (2000), os seminolipídios contribuem para a estrutura e estabilidade da membrana espermática. Em ratos foi demonstrado que os seminolipídios correspondem aos principais glicolipídios dos espermatozoides e provavelmente tem uma importante função na espermatogênese, sendo sintetizados na fase inicial de espermatócitos e

mantidos em subsequentes estágios das célula germinativas (HANDA et al., 1974; LINGWOOD, 1985). Segundo Fujimoto et al. (2000), a deficiência da galactosiltransferase (CGT) UDP- galactose:ceramida, enzima responsável pela síntese desses seminolípidios, impede o processo espermatogênico normal (FUJIMOTO et al., 2000).

De acordo com Woods et al. (2016), o espermatozoide equino possui altos níveis de sulfato e uma variedade limitada de éster colesterol. A quantidade de colesterol é quatro vezes maior na região acrossomal do que em outras regiões ao longo do espermatozoide (DE LEEUW et al., 1990) e em conjunto com os esfingolípidios (BROWN; ROSE, 1992) são essenciais durante a reação acrossomal por possuir funções regulatórias na fluidez e na estabilidade da bicamada lipídica pela sua interação com os fosfolípidios (PARKS; GRAHAM, 1992; PARKS, 1997; ZITRANSKY et al., 2010).

2.3 Composição lipídica do plasma seminal

O sêmen é constituído por duas diferentes frações: espermatozoides (<1% do volume total) e plasma seminal (WITE, 1988) que é formado por fluidos provenientes do testículo, epidídimos e glândulas acessórias (KARESKOSKI; KATILA, 2008). Os componentes do plasma seminal estão em quantidades variadas e incluem proteínas, enzimas, lipídios, antimicrobianos, imunoglobulinas, hormônios e íons (WITE, 1988; GARNER; HAFEZ, 2004) e servem como um meio carreador para os espermatozoides atingirem o trato reprodutivo feminino, cujos constituintes estão associados à função e fertilidade espermática (DACHEUX et al., 2003, GATTI et al., 2004).

O conteúdo lipídico do plasma seminal é em torno de 2%, nos quais fosfolípidios e colesterol correspondem a quase 90% (KOMAREK et al., 1965). Segundo Manjunath et al. (2007), a contínua exposição do espermatozoide ao plasma seminal parece prejudicar a membrana plasmática, tornando-o mais criossensível, já que certas proteínas presentes neste fluido induzem a alterações da membrana plasmática por apresentar especificidade para fosfolípidios com cabeça do grupo colina como as fosfatidilcolinas e esfingomielinas e estimular o efluxo de colesterol e fosfolípidios.

Assim como a proteína plasmática bovina seminal (BSP-1), as proteínas

do plasma seminal equino (HSP-1/2) se interagem especificamente com resíduos de colina dos fosfolipídios de membrana durante a ejaculação (GREUBE et al., 2004; EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005) estimulando o efluxo de colesterol e fosfolipídios associadas às moléculas envolvidas na capacitação espermática, como a heparina (DESNOYERS; MANJUNATH, 1992; MANJUNATH; THÉRIEN et al., 2002).

Em humanos, Schiller et al. (2000) observaram que o perfil lipídico do plasma seminal, ao contrário dos espermatozoides, é caracterizado por quantidade significativa de esfingomielina e colesterol. Enquanto que na espécie equina, esse fluido é constituído por baixas concentrações de esfingomielina (SM 18:1/16:0 e SM 18:1/24:0), série limitada de etanolamina e ausência de fosfatidilcolinas. Além de uma quantidade expressiva de fosfatidiletanolamina com ácidos graxos mono ou di-insaturados (WOODS et al., 2016).

Em humanos sabe-se que estes glicerofosfolipídios do plasma seminal, além do colesterol, estão presentes nos prostassomos, que são vesículas provenientes das células epiteliais da próstata e apresentam funções regulatórias relacionadas com a estabilização da membrana plasmática, melhora da motilidade espermática e proteção dos espermatozoides no trato reprodutivo feminino (SAEZ et al., 2003; BROUWERS et al., 2013). Nos equinos essas vesículas são menos abundantes e se caracterizam pela presença significativa dos ácidos 22:4 ω 6 na maioria dos lipídios. As esfingomielinas apresentam ácidos graxos basicamente saturados e mono- insaturados (em ambas as espécies (ARIENTI et al., 2001).

2.4 Princípios da criopreservação

O processo de criopreservação de sêmen envolve a queda de temperatura, desidratação da célula espermática, congelação e descongelação (MEDEIROS et al., 2002).

O sêmen é inicialmente resfriado da temperatura corpórea (37°C) para temperatura ambiente (20°C), o que não prejudica os espermatozoides quando diluídos em meios adequados (KEITH, 1998). O estresse inicial ocorre quando o espermatozoide atinge a temperatura de 19 aos 8°C (SQUIRES et al., 1999) no qual a membrana plasmática passa pela fase de transição, do estado líquido

cristalino para o estado gel (GRAHAM, 1996; MEDEIROS et al., 2002). A permeabilidade da membrana aumenta (ROBERTSON et al., 1988), provavelmente em vista das mudanças nos canais protéicos específicos, nas quais a regulação do cálcio é afetada e causa alterações semelhantes a capacitação espermática (WATSON, 2000).

O resfriamento inadequado pode promover um fenômeno chamado choque frio, que acarretam em alterações e danos à motilidade, metabolismo, membrana plasmática e acrossomo da célula espermática (GRAHAM, 1996; SQUIRES et al., 1999).

Tais crioinjúrias podem ser minimizadas pelo controle de resfriamento, com o uso de curvas de refrigeração lenta e por meios diluentes específicos (WATSON, 1995; GRAHAM 1996). A curva de refrigeração interfere na integridade da célula espermática. Na curva muito lenta, a água extracelular congela e a alta concentração de sal intracelular causa danos osmóticos ao espermatozoide causando perda rápida de água e consequente desidratação celular (AMANN; PICKETT, 1987). Enquanto que na curva muito rápida haverá a formação de cristais de gelo, causando danos físicos na célula em vista da ausência de perda de água pela célula (MAZUR, 1984).

Quando a célula é resfriada abaixo de 5°C ocorre um super-resfriamento, já que seu ponto de congelamento é abaixo de 0°C. Entre -5 e -10°C há o início da formação de cristais, no qual a curva deve ser lenta para que não ocorra o congelamento da água intracelular e ao mesmo tempo rápida para evitar com que a célula desidratada entre em contato com o meio hiperosmótico. A faixa crítica de danos na congelação ocorre entre -15°C e -60°C. Após atravessar essa temperatura, a atividade metabólica e as reações cessam e as células ficam inativas (MAZUR, 1984).

Durante o descongelamento como ocorre o reequilíbrio da água, as células são submetidas a um desafio hipotônico (PETRUNKINA, 2007); no qual a velocidade da descongelação vai depender da velocidade de resfriamento da célula, ou seja, rápida ao ponto de induzir o congelamento intracelular, ou lenta para desidratar a célula espermática. No caso do resfriamento rápido, a descongelação deverá ser igualmente rápida para evitar a recristalização intracelular, já que os espermatozoides são expostos por um menor tempo ao

soluto concentrado e ao crioprotetor. Assim, a restauração do equilíbrio intra e extracelular é mais rápido do que no descongelamento mais lento (FISCHER et al., 1987).

2.5 Efeitos da criopreservação sobre a qualidade espermática

Em média 50% dos espermatozoides sobrevivem à criopreservação (WATSON, 2000), além de apresentar algum grau de dano, como diminuição de motilidade, viabilidade, integridade acrossomal e perda da capacidade fecundante (BALL, 2008; BRAVO et al., 2005; MARTIN et al., 2007).

Um dos principais danos observados neste processo é a diminuição da motilidade progressiva (OEHNINGER et al., 2000) necessária para penetração na junção útero-tubárica durante a fecundação (QUINTERO-MORENO et al., 2004). A motilidade demonstra o *status* energético do espermatozoide, sendo que sua hiperativação facilita a penetração das secreções mucosas da tuba uterina e da zona pelúcida e seleciona os espermatozoides que tenham completado uma parte do processo de capacitação (SUAREZ, 2008).

A motilidade espermática pode ser alterada se as mitocôndrias estiverem afuncionais, a membrana plasmática estiver lesada ou se os espermatozoides sofrerem choque térmico (KIRK et al., 2001).

As lesões de membrana plasmática ao processo de criopreservação acarretam em alterações na organização bidimensional lipídica (HOLT, 2000), uma vez que esta estrutura atua como uma barreira entre o meio intra e extracelular, sendo responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico e consequentemente pela capacidade fertilizante do espermatozoide (FLESCH; GADELLA, 2000).

Os dois folhetos da bicamada da membrana diferem no teor de fosfolipídios, no qual a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina concentram-se no folheto interno; enquanto que a esfingomielina e a fosfatidilcolina estão concentrados na porção externa. Durante a apoptose, a fosfatidilserina é translocada do folheto interno para o externo da membrana plasmática; tornando-se pouco permeável e perdendo sua assimetria progressivamente (GADELLA et al., 2000).

Outro efeito indesejável causado pela criopreservação do sêmen é a

peroxidação lipídica da membrana que resulta em uma produção anormal de espécies reativas de oxigênio (ROS) (AITIKEN; KRAUSZ, 2001). Ao terem contato com PUFA's da membrana espermática geram radicais peroxil e alcóxil e para se tornarem moléculas estáveis, retiram um hidrogênio de uma dupla ligação de um lipídio vizinho gerando um ácido ou álcool correspondente e o transforma em um radical livre, que por sua vez irá agir em outra PUFA, desencadeando uma cascata de peroxidação (BILESKEI et al., 1983).

As alterações da membrana causadas pela peroxidação desencadeiam processos apoptóticos resultando em danos que incluem perda de fluidez e da capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle da motilidade espermática e alterações no metabolismo celular (BECONI et al., 1993).

3. HIPÓTESE

A composição lipídica da célula espermática influencia na crioresistência de espermatozoides equinos submetidos à congelação?

4. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi correlacionar o perfil lipídico do sêmen equino com a qualidade espermática pós- descongelação.

5. REFERÊNCIAS¹

AITIKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 497-506, 2001.

AITIKEN, R. J.; WINGATE, J. K.; DE IULIIS, G. N.; KOPPERS, A. J.; MCLAUGHLIN, E. A. Cis unsaturated fatty acid stimulate reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in human spermatozoa. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, p. 4154-4163, 2009.

AKSOY, Y.; AKSOY, H.; ALTINKAYNAK, K.; AYDIN, H. R.; ÖZKAN, A. Sperm fatty acid composition in subfertile men. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.**, v. 75, p. 75-79, 2006.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; MEDEIROS, A. S. L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 89, p. 105-113, 2005.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **J. Androl.**, v. 13, p. 232-241, 2008.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 7, p. 145-173, 1987.

ARIENTI, G.; POLCI, A.; DE COSMO, A.; SACCARDI, C.; CARLINI, E.; PALMERINI, C. A. Lipid fatty acid and protein pattern of equine prostasome-like vesicles. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v. 128, p. 661-666, 2001.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação- Referências- Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24p.
NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. **List of journals indexed in Index Medicus**. Washington, 2008. 337p.

ATTAR, M.; KATES, M.; BOU KHALIL, M.; CARRIER, D.; WONG, P. T.; TANPAHICHITR, N. A Fouriertransform infrared study of the interaction between germ-cell specific sulfagalactosylglycerolipid and dimyristoylglycerophosphocholine. **Chem. Phy. Lipids**, v. 106, p. 101-114, 2000.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: impacts on sperm function and preservation in the horse. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 107, p. 257-267, 2008.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **J. Androl.**, v. 21, p. 895-902, 2000.

BECONI, M. T.; FRANCIÀ, C. R.; MORA, N. G.; AFFRANCHINO, M. A. Effects of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p. 841-851, 1993.

BEIRÃO, J.; ZILLI, L.; VILELLA, S.; CABRITA, E.; FERNANDÉZ-DIEZ, C.; SCHIAVONE, R.; HERRÁEZ, M. P. Fatty acid composition of the head membrane and flagella affects *Sparus aurata* sperm quality. **J. Appl. Ichthyol.**, v. 28, p. 1017-1019, 2012.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRAYER, L. **Biochemistry**. 5. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002.

BILESKEI, B. H. J.; ARUDI, R. L.; SUTHERLAND, M. W. A study of the reactivity of HO_2/O_2 with unsaturated fatty acids. **J. Biol. Chem.**, v. 254, p. 4759–4761, 1983.

holtBRAVO, M. M.; APARICIO, I. M.; GARCIA-HERREROS, M.; GIL, M. C.; PEÑA, F. J.; GARCÍA-MARÍN, L. J. Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation like state in boar spermatozoa. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 71, p. 88-96, 2005.

BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; BAUER, J. E.; MAPCPHERSON, M. L.; VARNER, D. D. Cholesterol-to-phospholipid ratio in whole sperm and seminal plasma from fertile stallions and stallions with unexplained subfertility. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 99, p. 65-71, 2007.

BROUWERS, J. F.; AALBERTS, M.; JANSEN, J. W.; VAN NIEL, G.; WAUBEN, M. H.; STOUT, T. A.; HELMS, J. B.; STOORVOGEL, W. Distinct lipid compositions of two types of human prostasomes. **Proteomics**, v. 13, n. 10-11, p. 1660-1666, 2013.

BROWN, D. A.; ROSE, J. K. Sorting of GPI- anchored proteins to glycolipid enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. **Cell**, v. 68, p. 533-544, 1992.

DACHEUX, J. L.; GATTI, DACHUEX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microsc. Res. Tech.**, v. 61, p. 7-17, 2003.

DE LEEUW, F. E.; CHEN, H. C.; COLENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. Cold-induced ultra-structural changes in bull and boar sperm plasma membranes. **Cryobiology**, v. 27, p. 171-183, 1990.

DESNOYERS, L.; MANJUNATH, P. Major proteins of bovine seminal plasma exhibit novel interactions with phospholipids. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 10149-10155, 1992.

EDDY, E. M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994. cap. 2, p. 29-77.

EDIDIN, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 4, p. 414-418, 2003.

EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SCHÄFER, B.; KIRCHHOFF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MÜLLER, P.; TÖPFER-PETERSEN, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 70, p. 45-57, 2005.

FERRUSOLA, C. O.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, J. M. Lipidperoxidation assessed with BODIPY-C11, cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion- dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v. 138, n. 1, p. 55-63, 2009.

FISCHER, P. S.; AINSWORTH, L.; FAIRFULL, R. W. Evaluation of anew diluent and different processing procedures for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 28, p. 599-607, 1987.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1469, n. 2, p. 197-235, 2000.

FUJIMOTO, H.; TADANO-ARITOMI, K.; TOKUMASU, A.; ITO, K.; HIKITA, T.; SUZUKI, K.; ISHIZUKA, I. Requirement of seminolipid in spermatogenesis revealed by UDP-galactose: ceramide galactosyltransferase-deficient mice. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 22623-22626, 2000. doi: 10.1074/jbc.C000200200.

GADELLA, B. M.; GADELLA, T. W.; COLENBRANDER, B.; VAN GOLDE, L. M.; LOPEZ-CARDOZO, M. Visualization and quantification of glycolipid polarity dynamics in the plasma membrane of the mammalian spermatozoon. **J. Cell Sci.**, v. 107, p. 2151-2163, 1994.

GADELLA, B. M.; HARRISON, R. A. P. The capacitating agent bicarbonate induces protein kinase A-dependent changes in phospholipid transbilayer behavior in the sperm plasma membrane. **Development**, v. 127, p. 2407-2420, 2000.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BEVERS, M. M.; BROUWERS, J. F. H. M.; NEILD, D.; COLENBRANDER, B. **The role of lipid dynamics in equine sperm plasma membrane function**. Cambridge: Newmarket R & W Publications, 2001. p. 24. (Havemeyer Foundation Monograph Series, n. 5).

GARCÍA, B. M.; FERNANDEZ, L. G.; FERRUSOLA, C. O.; BOLANOS, J. M. G.; MARTINEZ, H. R.; TAPIA, J. A.; MORCUENDE, D.; PENA, F. J. Fatty acids and

plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 75, p. 811-818, 2011.

GARCÍA, B. M.; FERNANDEZ, L. G.; FERRUSOLA, C. O.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; RODRIGUEZ, M. A.; MARTINEZ, H. R.; TAPIA, J. A.; MORCUENDE, D.; PEÑA, F. J. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 46, n. 1, p. 141-148, 2010.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozoide e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. cap. 7, p. 97-110.

GATTI, J. L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; METAYER, S.; THIMON, V.; DAUCHEUX, J. L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82, p. 321-339, 2004.

GORGAS, K.; TEIGLER, A.; KOMLJENOVIC, D.; JUST, W. W. The ether lipid-deficient mouse: Tracking down plasmalogen functions. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 1763, p. 1511-1526, 2006.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Reprod. Technol.**, v. 12, p. 131-145, 1996.

GREUBE, A.; MÜLLER, K.; TÖPFER-PETERSEN, E.; HERRMANN, A.; MÜLLER, P. Interaction of Fn type II proteins with membranes: stallion seminal plasma protein SP-1/2. **Biochemistry**, v. 43, p. 464-472, 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 1014 p.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J. Androl.**, v. 11, p. 73-88, 1990.

HANDA, S.; YAMATO, K.; ISHIZUKA, I.; SUZUKI, A.; YAMAKAWA, T. Biosynthesis of seminolipid: sulfation in vivo and in vitro. **J. Biochem.**, v. 75, p. 77-83, 1974.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

HONKE, K.; HIRAHARA, Y.; DUPREE, J.; SUZUKI, K.; POPKO, B.; FUKUSHIMA, K.; FUKUSHIMA, J.; NAGASAWA, T.; YOSHIDA, N.; WADA, Y.; TANIGUCHI, N. Paranodal junction formation and spermatogenesis require sulfoglycolipids. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, p. 4227- 4232, 2002.

HOWARTH, B.; TORREGROSSA, D.; BRITTON, W. M. The phospholipid content of ejaculated fowl and turkey spermatozoa. **Poult. Sci.**, v. 56, p. 1265-1268, 1977.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Anim. Reprod.**, v. 107, p. 249-256, 2008.

KEITH, S. L. **Evaluation of new cryoprotectants for the preservation of equine spermatozoa.** 1998. 104 f. Tese (Master of Science) - Colorado State University, Fort Collins, 1998.

KELSO, K. A.; CEROLINI, S.; NOBLE, R. C.; SPARKS, N. H. C.; SPEAKE, B. K. Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age, **J. Reprod. Fertil.**, v. 106, p. 201-206, 1996.

KIRK, E. S. **Flow cytometric evaluation of stallion sperm.** 2001. 131 f. Tese (Master of Science) - Colorado State University, Fort Collins, 2001.

KOMAREK, R. J.; PICKETT, B. W.; GIBSON, E. W.; LANZ, R. N. Composition of lipids in stallion semen. **J. Reprod. Fertil.**, v. 10, n. 3, p. 337-342, 1965.

LADHA, S. Lipid herogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **J. Membr. Biol.**, v. 165, n. 1, p. 1-10, 1998.

LESSIG, J.; GEY, C.; SÜß, 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 ^{31}P NMR spectroscopy. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 137, p. 265-277, 2004.

LIN, D. S.; CONNOR, W. E.; WOLF, D. P.; NEURINGER, M.; HACHEY, D.L. Unique lipids of primate spermatozoa: desmosterol and docosahexaenoic acid. **J. Lipid. Res.**, v. 34, p. 491-499, 1993.

LINGWOOD, C. A. Timing of sulphogalactolipid biosynthesis in the rat testis studied by tissue autoradiography. **J. Cell Sci.**, v. 75, p. 329-338, 1985.

LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 105, n. 1-2, p. 119-128, 2008.

MANJUNATH, P.; BERGERON, A.; LEFEBVR J.; FAN, J. Seminal plasma proteins: functions and interaction with protective agents during semen preservation. **Soc. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 65, p. 227-228, 2007.

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

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. **Male reproductive function and semen**. Berlin: Springer-Verlag, 1981.

MARTIN, G.; CAGNON, N.; SABIDO, O.; SION, B.; GRIZARD, G.; DURAND, P.; LEVY, R. Kinetics of occurrence of some features of apoptosis during the cryopreservation process of bovine spermatozoa. **Hum. Reprod.**, v. 22, p. 380-388, 2007.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am. J. Physiol.**, v. 247, p. 125-142, 1984.

McMAHON, A.; LU, H.; BUTOVICH, I. A. A role for ELOVL4 in the mouse

meibomian gland and sebocyte cell biology. **Invest Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 55, p. 2832-2840, 2014.

MEDEIROS, C. M.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't better. **Theriogenology**, v. 57, p. 327-344, 2002.

MELLVILLE, D. F.; JOHNSTON, S. D.; MILLER JUNIOR, R. R. Flying-fox (Pteropus spp.) sperm membrane fatty acid composition, its relationship to cold shock injury and implications for cryopreservation success. **Cryobiology**, v. 65, n. 3, p. 224-229, 2012.

MILLER JUNIOR, R. R.; CORNETT, C. L.; WATERHOUSE, K. E.; FARSTAD, W. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (Vulpes vulpes) and blue (Alopex lagopus) foxes, and their relationship to cell preservation. **Cryobiology**, v. 51, n. 1, p. 66-75, 2005.

MURRAY, R. H.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. **Harper Bioquímica**. 7. ed. São Paulo: Atheneu, 1994. p. 763.

NAGAN, N.; ZOELLER, R. A. Plasmalogens: biosynthesis and functions. **Prog. Lipid. Res.**, v. 40, p. 199-229, 2001. Disponível em: <[http://doi:10.1016/S0163-7827\(01\)00003-0](http://doi:10.1016/S0163-7827(01)00003-0)>. Acesso em: 10 jun. 2016.

OEHNINGER, S.; DURU, N. K.; SRISOMBUT, C. Assessment of sperm cryodamage e strategies to improve outcome. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 169, p. 3-10, 2000.

PARKS, J. E. Hypothermia and mammalian gametes. In: KAROW, A. M.; CRITSER, J. K. (Eds.). **Reproduction tissue banking**: scientific principles. San Diego: Academic Press, 1997. p. 229-261.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior

of boar, bull, stallion, and rooster sperm membrane. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255-266, 1992.

PETRUNKINA, A. Fundamental aspects of gamete cryobiology. **J. Reproduk. Endokrinol.**, v. 4, n. 2, p. 78-91, 2007.

POULOS, A.; DARIN-BENNETT; A.; WHITE, I. G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 46, p. 541-549, 1973.

QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. **Theriogenology**, v. 61, p. 673-690, 2004.

RAVIE, O.; LAKE, P. E. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of fowl and turkey spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 9, p. 189-192, 1985.

ROBERTSON, L.; WATSON, P. F.; PLUMMER, J. M. Prior incubation reduces calcium uptake and membrane disruption in boar spermatozoa subjected to cold shock. **Cryo-Lett.**, v. 9, p. 286-293, 1988.

SAEZ, F.; FRENETTE, G.; SULLIVAN, R. Epididymosomes and prostasomes: their roles in posttesticular maturation of the sperm cells. **J. Androl.**, v. 24, p. 149-154, 2003.

SCHILLER, J.; ARNHOLD, J.; GLANDER, H. J.; ARNOLD, K. Lipids analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy – effects of freezing and thawing. **Chem. Phys. Lipids**, v. 106, p. 145-156, 2000.

SINGER; S. J.; NICHOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, p. 720-731, 1972.

SIQUEIRA, J. B. **Relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com teste de avaliação espermática in vitro**. 2004. 91 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

SIRRI, F.; MELUZZI, L.; PARDO RAMIRES, C.; FRANCHINI, A. Fatty acid composition of lipid in eggs laid by hens fed diets supplemented with different fats. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON QUALITY OF EGG AND EGG PRODUCTS, 6., 1995, Zaragoza. **Proceedings...** Zaragoza, 1995. p. 411-419.

SQUIRES, E. L.; PICKETT, B. W.; GRAHAM, J. K.; VANDERWALL, D. K.; McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. **Cooled and frozen stallion semen**. Fort Collins: College of Veterinary Medicine and Biomedical, 1999.

STUBBS, C. D.; SMITH, A. D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 779, p. 89-137, 1984.

SUAREZ, S. S. Control of hyperactivation in sperm. **Hum. Reprod. Update.**, v. 14, n. 6, p. 647-657, 2008.

SUGKRAROEK, P.; MORRIS, K.; LEADER, A.; TANPHAICHITR, N. Levels of cholesterol and phospholipids in freshly ejaculated sperm and percoll-gradient-pelleted sperm from fertile and unexplained infertile men. **Fertil. Steril.**, v. 55, p. 820-827, 1991.

UENO, K.; ISHIZUKA, I.; YAMAKAWA, T. Glycolipid composition of human testis at different ages and the stereochemical configuration of seminolipid. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 487, p. 61-73, 1977.

WASSAL, S. R.; STILWELL, W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1788, n. 1, p. 24-32, 2009.

WATERHOUSE, K. E.; HOFMO, P. P.; TVERDAL, A.; MILLER JUNIOR, R. R. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. **Reproduction**, v. 131, n. 5, p. 887-894, 2006.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil.**

Dev., v. 7, p. 871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, n. 2, p. 481-492, 2000.

WHITE, D.; WEERACHATYANUKUL, W.; GADELLA, B.; KAMOLVARIN, N.; ATTAR, M.; TANPHAICHITR, N. Role of sperm sulfogalactosylglycerolipid in mouse sperm-zona pellucida binding. **Biol. Reprod.**, v. 63, p.147-155, 2000.

WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold-shock and preservation: a review. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 5, p. 639-658, 1993.

WITE, R. G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. In: HAFEZ, E. S. B. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1988. p. 212-228.

WOOD, P. L.; SCOGGIN, K.; BALL, B. A.; TROEDSSON, M. H.; SQUIRES, E. L. Lipidomics of equine sperm and seminal plasma: Identification of amphiphilic (O-acyl)- ω -hydroxy-fatty acids. **Theriogenology**, v.86, p. 1212-1221, 2016.

ZALATA, A. A.; CHRISTOPHE, A. B.; DEPUYDT, E.; SCHOONJANS, F.; COMHAIRE, F. H. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. **Mol. Hum. Reprod.**, v. 4, p. 111-118, 1998.

ZITRANSKY, N.; BORTH, H.; ACKERMANN, F.; MEYER, D.; VIEWEG, L.; BREIT, A.; GUDERMANN, T.; BOEKHOFF, I. The “acrosomal synapse”: subcellular organization by lipid rafts and scaffolding proteins exhibits high similarities in neurons and mammalian spermatozoa. **Commun. Integr. Biol.**, v. 3, p. 513-521, 2010.

CAPÍTULO 2

Seminal lipidomic influences in the cryoresistance of equine spermatozoa**ABSTRACT**

The sperm membrane is composed of a great amount of lipids, whose composition is directly related to membrane fluidity and fertilization process, but also to cellular cryoresistance. In view of the variation in the sensitivity degree to freezing the semen in stallions, this study aimed to describe and correlate equine semen lipids and post-thawing sperm parameters. We used ejaculates of 34 stallions, which were evaluated (total motility $\geq 60\%$), frozen and reevaluated for spermatoc kinetics, membrane integrity and lipid peroxidation. Lipid extraction of the fresh semen samples was performed with methanol-chloroform and lipid analysis was conducted by mass spectrometry MALDI-TOF. Based on sperm parameters after thawing, the animals were separated into two groups, resistant (Good, $n = 5$) and sensitive (Bad, $n = 6$) to freezing, and the results were compared with the abundance of the identified lipid ions. We found 45 ions in the Good and Bad groups, with mass/charge (m/z) ranging from 700.6 to 859.0. The animals from Good group had a higher relative abundance of phosphatidylcholines represented by 4 ions (ions of m/z 846.6, 727.0, 810.6 and 854.6), whereas in Bad only 1 ion (m/z 782.6). The plasmalogen phosphatidylcholine (m/z 796.6) was also abundantly found in the Good group. Sphingomyelin (m/z 703.5) and phosphatidylethanolamine (m/z 760.6) were observed in greater abundance in the Bad group. There was a positive correlation between phosphatidylcholine (m/z 812.6, 832.6, 836.6 and 838.6) and thawed sperm kinetic. Moreover, the sphingomyelin (m/z 725.5) was positively correlated with fresh and thawed sperm kinetic. The ion m/z 717.5, identified as phosphatidic acid was negatively correlated with lipid peroxidation suggesting that ion could be associated with sperm

cryoresistance. We concluded that lipid semen composition can influence the sperm resistance to cryopreservation, to interfere on kinetic, membrane integrity and lipid peroxidation.

Keywords: lipid-profile, MALDI-TOF MS, freeze-semen, spermatozoa.

1. Introduction

The equine sperm cells present greater sensitivity to the cryopreservation process and an there is expressive individual variation [1,2]. The possible explanation for this is the sperm membrane lipid composition, whose bi-dimensional lipid layer organization is altered during freezing [3].

The lipid constitution of the sperm membrane has been investigated in several species, such as swine, birds, horses, rats and humans [4-8] and was characterized by a variety of phospholipids and polyunsaturated fatty acids (PUFAs) [6,9]. And to maintain the cellular structure and the various functions, such as maintenance of fluidity and sperm functionality [10,11].

Studies have shown that spermatozoa have a significant amount of phosphatidylcholines, which are involved in the acrosomal response and the highest sperm cryoresistance [12,13]. In addition to plasmalogens combined with PUFAs, which provides to membrane antioxidant properties [6,14]. They are also associated with motility, concentration, morphology and sperm viability [15]. In view this, the increased variability in lipid concentrations between individuals of the same species [16] may be associated with the sperm ability to survive to freezing process.

Although there are several techniques for analyzing the morphological and functional quality of sperm cells, the correlation between the seminal lipids and the sperm parameters of stallions has not been studied, which could allow a better understanding of

the events that regulate the fertilizing capacity. Thus, the present study aims to relate the lipid composition of the stallion semen with sperm quality after sperm freezing.

2. Material and methods

Ethical aspects

The study was conducted in accordance with the ethical guidelines recommended by the National Council for the Control of Animal Experimentation and the College of Animal Experimentation and was approved by the Institution's Animal Care and Experimentation Ethics Committee (Protocol Number 162/2016).

Animals and groups

Thirty four healthy stallions were used body mass between 400 and 600 kg, aged 7 and 15 years. All males were from Center for Reproduction quality and had proven fertility.

The stallions were distributed according with sperm cryoresistance in two groups, Bad (sensible to cryopreservation), which was represented by males with $\leq 25\%$ percentile to total ($\leq 37.5\%$) and progressive motility ($\leq 12.0\%$), and rapid sperm percentage ($\leq 20.5\%$); and Good (resistant to cryopreservation) with $\geq 75\%$ percentile to total ($\geq 52.3\%$) and progressive motility ($\geq 21.3\%$), and rapid sperm percentage ($\geq 35.3\%$) after thawed.

Semen collection and processing

The semen was collected by artificial vagina Botucatu model (Botupharma, Botucatu, SP, Brazil). The gel fraction was removed using a nylon filter. Sperm concentration was determined in Neubauer chamber and the semen was diluted in commercial extender (Botu-sêmen®, Botupharma, Botucatu, SP, Brazil). Thus, the samples were centrifugated

at 600xg by 10 min [17], and the sediment was resuspended in commercial extender (Botucio®, Botupharma, Botucatu, SP, Brazil) at 200×10^6 sperm cells/mL. The semen diluted was packed in 0.5 mL in French straws, maintained at 5° C by 20 min (Minitub®, Tiefenbach, Germany), frozen in liquid nitrogen vapor for more 20 min and then immersed and stored in cryogenic cylinder [18].

The straws were thawed at 37° C, during 30 sec and the sperm parameters reevaluated.

Sperm kinetics

Sperm kinetic parameters were assessed by computer-assisted sperm analysis – CASA system (IVOS-12 Sperm Analyzer, Hamilton Thorne Biosciences Inc, Beverly, MA, USA). The total (TM, %) and progressive motility (PM, %), average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), straight-line velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), oscillation coefficient (WOB) and rapid sperm percentage (RAP, %) (Table 1).

Flow cytometry

The sperm cells were evaluated by flow cytometry using the BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipped with excitation lasers (blue 488-nm, 100 mW and emission filters 530/30nm and 695/40nm ; red 640-nm, 40 mW with emission filter 660/20nm; and violet 405-nm, 100 mW, with the emission filter 450/50 nm). At least 10,000 cells per sample were analyzed and the data evaluated by BD software FACSDiva™ software v. 6.1.

Table 1.

Setup parameters used in CASA system analysis

Characteristic	Setup
Points number examined	30
Cells contrast related to the field	60 pixels
Minimum cell size	3 pixels
Contrast to static cells	30 pixels
Lower limit for rectilinear index	80 %
Mean velocity reference (VAP)	<70 $\mu\text{m/s}$
Slow velocity reference (VAP)	<30 $\mu\text{m/s}$
Slow velocity reference (VSL)	<20 $\mu\text{m/s}$
Magnification	1,95
Chamber	Makler ¹

¹ Hamilton Thorne Biosciences Inc, Beverly, MA, USA

An semen aliquot diluted in TALP-PVA (according to Parrish et al. [19] modified: 100 mM NaCl, 3.1 mM KCl, 25.0 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 21.6 mM DL 60% sodium lactate, 2.0 mM CaCl₂, 0.4 mM MgCl₂, 10.0 mM Hepes-free 1.0 $\mu\text{g/mL}$ polyvinyl alcohol-PVA and 25 $\mu\text{g/mL}$ gentamicin) in a total 489 μL containing 5×10^6 sperm/mL was added 5 μL Hoechst 33342 (7 μM in distilled water, H342, 14533, Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) to identify cell events, excluding cellular debris. Thus, 5 μL propidium iodide (1(Pi, P4170, Sigma-Aldrich Co.) for identification of cells with plasma membrane damage. Those cells considered as intact cells (CI) were PI negative. The C11-BODiPY 0.5 μL (1 μM in DMSO, D-3861; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for lipid peroxidation according to Guasti et al. [20]. The cells with lipid peroxidation (PERO) were considered positive for C11-BODiPY. Samples were incubated in a water bath at 37° C for 30 minutes and then washed twice at 300xg for 5 min, then resuspended and evaluated by flow cytometry.

Lipidomic analysis

Samples containing 50×10^6 sperm cells were separated and stored at -196°C to lipidomic analysis. The lipids were extracted in according to Bligh and Dyer [21], with modifications. Briefly, an aliquot was thawed at room temperature, resuspended in 1 mL of saline phosphate buffer (PBS) and homogenized by 3 min. The sample was centrifuged at $12,000 \times g$ by 1 min. Thus, the supernatant was discarded and procedure repeated one more time. The sediment was added to 0.5 mL chloroform-methanol solvent mixture (2:1, v/v) and homogenized by 5 min. Thus, the sample was centrifuged at $5,000 \times g$ by 3 min, in room temperature. The bottom layer, containing lipids, was taken and stored at -196°C .

The samples were thawed and the lipids elution carried out with 10 μL chloroform. An aliquot (1 μL) of lipid extract was placed on plate and covered with matrix solution (1 μL of 2,5-dihydroxybenzoic acid, 30 mg/mL in methanol). The plate was disposed in the equipment (Ultraflex II MALDI-TOF/TOF with Smartbeam TM laser technology, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) to perform matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS). The equipment was calibrated using a phospholipid mixture of known composition. Positive mass spectral signals were acquired in reflector mode in a mass (m/z) range from 700 to 1000. Raw mass spectra were processed using FlexAnalysis Software (version 3.0, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) by baseline correction and noise removal.

Lipid subclasses were attributed on literature search and in the Human Molecular Database (HMDB) (<http://www.hmdb.ca>). Mass error in ppm was calculated for the ions found and was considered only when the mass error was ≤ 50 ppm.

Statistical analysis

The sperm kinetics and flow cytometry variables were described by the median, minimum, maximum, 25% and 75% percentile, mean, standard deviation and standard

error. The variable comparison was performed by t-test (parametric variables) or Mann-Whitney (non-parametric variables) based on Kolmogorov-Smirnov test (K-S) results, which checked variable distribution.

In lipidomic analysis the data normalization was done to cut out ions present in less than three animals and also when the same ion was excluded in both groups (Bad and Good), this was removed from the analysis. Moreover, the value of the ionic count of each ion in each animal was divided by the animal's total ion count and the result of the division was used for statistical analysis.

The multivariate statistical analysis from lipidomic data was performed in MetaboAnalyst 2.0 online free-software [22]. To analysis we used principal component analysis (PCA) for description of sample variation and partial least squares–discriminant analysis (PLS-DA). The abundance of lipid species was identified using ANOVA followed by the Tukey's test. Volcano plot was used to compare the groups, using the criteria $P \text{ value} \leq 0.05$ and fold-change (HR) ≥ 1.5 .

The correlation of the lipids, flow cytometry and sperm kinetics variables was analyzed by the Pearson correlation test. The correlation coefficient was classified as null ($r = 0$), low ($0 < r \leq 0.30$), moderate ($r = 0.30 < r \leq 0.70$) and strong ($0.7 < r \leq 1$) according Levine et al. [23]. These analyses were performed by the GraphPad Prism version 6.0 for Windows program (GraphPad software, LA Jolla, California, USA; www.graphpad.com). $P \text{ value} \leq 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

Fresh sperm parameters were increased than thawed data (Table 2). From all stallions, 17.6% ($n = 6$) were classified as Bad and 14.7% ($n = 5$) as Good group. The Fig. 1 and 2 showed sperm kinetics and flow cytometry results pre- and post-thawed from Bad and

Good group.

Table 2.

Descriptive parameters of fresh and thawed sperm from stallions.

Parameter	Median	Minimus	Maximus	25% Percentile	75% Percentile	Mean	Standard deviation	Standard error	
FRESH	TM	72.0	54.0	90.0	64.8	77.0	71.1	8.0	1.4
	PM	32.0	18.0	64.0	26.5	40.0	34.2	10.3	1.8
	VAP	117.0	92.0	141.0	106.8	125.0	116.7	11.6	2.0
	VSL	90.5	75.0	196.0	83.0	97.3	93.3	20.8	3.6
	VCL	207.0	114.0	274.0	193.0	219.5	204.1	28.2	4.9
	WOB	55.4	51.2	118.4	53.2	59.1	58.3	11.6	2.0
	RAP	63.0	44.0	87.0	54.0	69.3	62.3	10.7	1.9
	CI	68.0	44.0	96.0	61.5	82.5	71.6	14.4	2.5
	PERO	--	--	--	--	--	--	--	--
THAWED	TM	47.0	7.4	74.0	37.5	52.3	44.8	14.5	2.5
	PM	14.0	3.0	35.0	12.0	21.3	15.9	7.4	1.3
	VAP	81.5	63.0	170.0	76.5	87.8	84.5	17.8	3.1
	VSL	64.0	52.0	93.0	60.0	69.3	65.1	8.4	1.5
	VCL	152.0	120.5	189.0	138.5	162.3	151.2	16.1	2.8
	WOB	53.4	48.5	131.8	52.4	55.7	56.3	13.8	2.4
	RAP	28.5	4.5	77.0	20.5	35.3	28.7	15.0	2.6
	CI	25.3	3.9	50.7	15.0	29.9	23.5	10.8	1.9
	PERO	51.9	4.5	76.2	36.2	66.4	48.3	20.1	3.5

TM: total motility (%); PM: progressive motility (%); VAP: average path velocity ($\mu\text{m/s}$); VSL: straight-linear velocity ($\mu\text{m/s}$); VCL: curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$); WOB: oscillation coefficient (%); RAP: rapid sperm percentage (%); CI: integral cells (%); PERO: lipid peroxidation (%)

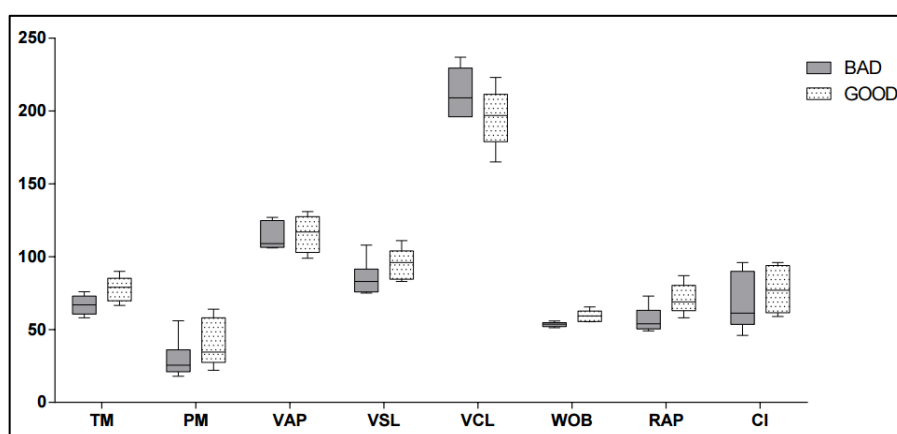


Fig. 1. Box plot of fresh sperm kinetics and membrane integrity from stallions of Bad and Good groups. TM: total motility (%); PM: progressive motility (%); VAP: path velocity ($\mu\text{m/s}$); VSL: linear velocity ($\mu\text{m/s}$); VCL: curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$); WOB: oscillation coefficient (%); RAP: rapid sperm percentage (%); CI: integral cells (%)

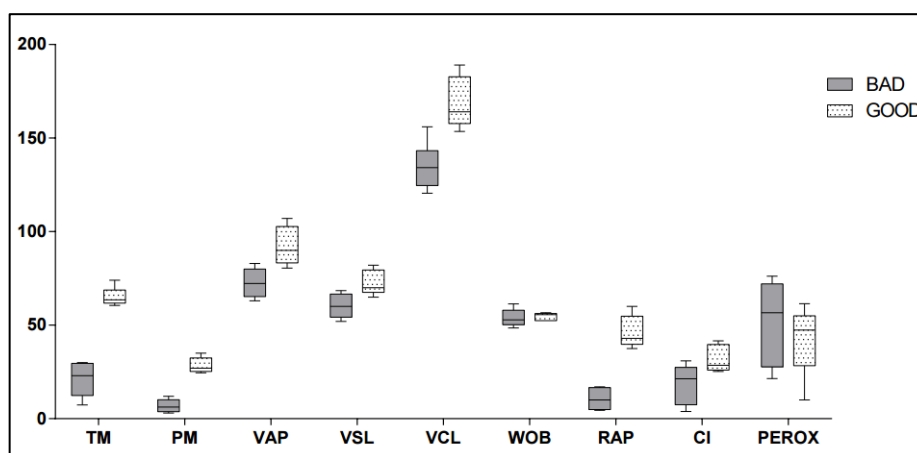


Fig. 2. Box plot of thawed sperm kinetics and membrane integrity from stallions of Bad and Good groups. TM: total motility (%); PM: progressive motility (%); VAP: path velocity ($\mu\text{m/s}$); VSL: linear velocity($\mu\text{m/s}$); VCL: curvilinear velocity ($\mu\text{m/s}$); WOB: oscillation coefficient (%); RAP: rapid sperm percentage (%); CI: integral cells (%); PERO: lipid peroxidation (%).

The spectra of main ions identified are showed in Table 3. A representative of phospholipid spectra found in the semen of one stallion through MALDI- MS was showed in Fig. 3.

The Fig. 4 represents the before and after the normalization data of lipidomic analysis performed in MetaboAnalyst 2.0 software.

From 34 stallions studied, 11 were classified in Bad ($n = 6$) and Good ($n = 5$) group, and other males were median cryoresistency and were not included in lipidomic analysis. We observed in the PCA that 3 animals were representatives of Good and 2 of Bad group (Fig. 5).

The fold-change analysis found 11 ions with absolute values ≥ 1.5 as represented in Fig. 6. Although this, the partial least squares - discriminant analysis (PLS-DA) (Fig. 7) indicated 10 ions correlated to cryoresistency in Bad and Good groups, which 6 were found in lower abundance in Bad (727.0, 732.6, 796.6, 810.6, 846.6 and 854.6) and higher in Good group. Eight ions were common in two analyses (727.0, 732.6, 760.6, 796.6,

806.6, 810.6, 846.6 and 854.6).

Table 3.

Major ions identified in matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in relation to the mass (m/z), lipid subclass and reference of the ion identification.

m/z	Lipid subclass	References
700.6	[PC (30:3) + H] ⁺	[24]
703.5	[SM (16:0) + H] ⁺	[24]
717.5	[PA (36:5) + 2H + Na] ⁺	[25]
725.5	[SM (16:0) + Na] ⁺	[24,26,27]
727.0	Oligomerisation product of DHB matrix	[28]
728.6	[PC (32:3) + H] ⁺ , [PEp (36:2) + H] ⁺ , [PEe (36:3) + H] ⁺	[24]
732.6	[PC (32:1) + H] ⁺ , [PEp (36:0) + H] ⁺ , [PEe (36:1) + H] ⁺	[24]
742.6	[PCp (34:2) + H] ⁺ , [PCe (34:3) + H] ⁺	[24]
748.6	[PCe (34:0) + H]	[29]
760.6	PE (18:0/20:0)	*
781.5	Not identified	--
782.6	[PC (36:4) + H] ⁺ , [PC (34:1) + Na] ⁺	[25,26]
792.6	[PC (38:6) Alkyl-Acyl + H] ⁺ [PE (38:6) Alkenyl - Acyl - H + 2 Na]	[30]
794.6	[PE (40:5) + H] ⁺ , [PCp (38:4) + H] ⁺ , [PCe (38:5) + H] ⁺	[24,31]
796.6	[PCp (38:3) + H] ⁺ , [PCe (38:4) + H] ⁺	[24]
806.6	PC (38:6) + H] ⁺ , [PC (36:3) + Na] ⁺	[31]
810.6	[PC (38:4) + H] ⁺ , [PC (36:1) + Na] ⁺	[24,25-27,31]
812.6	[PC (38:3) + H] ⁺	[24]
828.0	Not identified	--
830.6	[PCp (40:0) + H] ⁺ , [PCe (40:1) + H] ⁺ , [PC (38:5) + H] ⁺	[24,31]
832.6	[PC (38:4) + Na] ⁺	[26]
836.6	PC (22:2/ 18:3)	*
838.6	[PC (40:4) + H] ⁺	[24]
846.6	[PC (40:0) + H] ⁺	[24]

Identification based in literature and the **Human Molecular Database* (HMDB) (<http://www.hmdb.ca>). Abbreviations: PC phosphatidylcholine; PA phosphatidic acid; SM sphingomyelin; PE phosphatidylethanolamine; TAG triacylglycerol; PC with e and/or p refers to the subspecies plasmalogen and plasmalogenyl respectively.

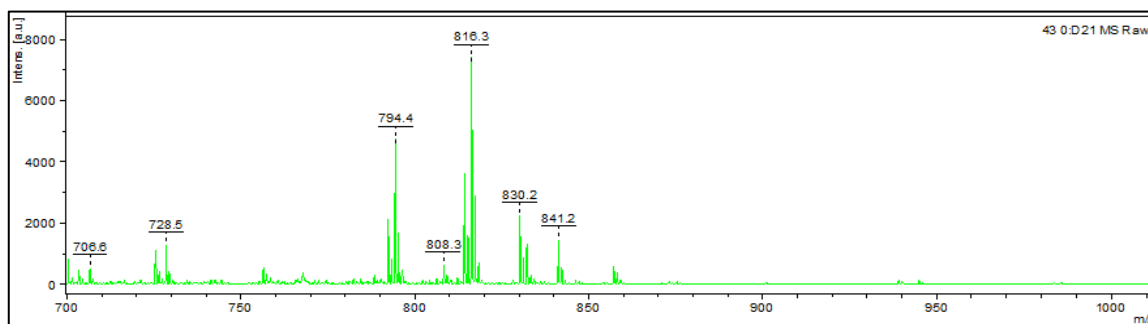


Fig. 3. Phospholipid representative mass spectra of semen from one stallion analyzed by MALDI-TOF MS.

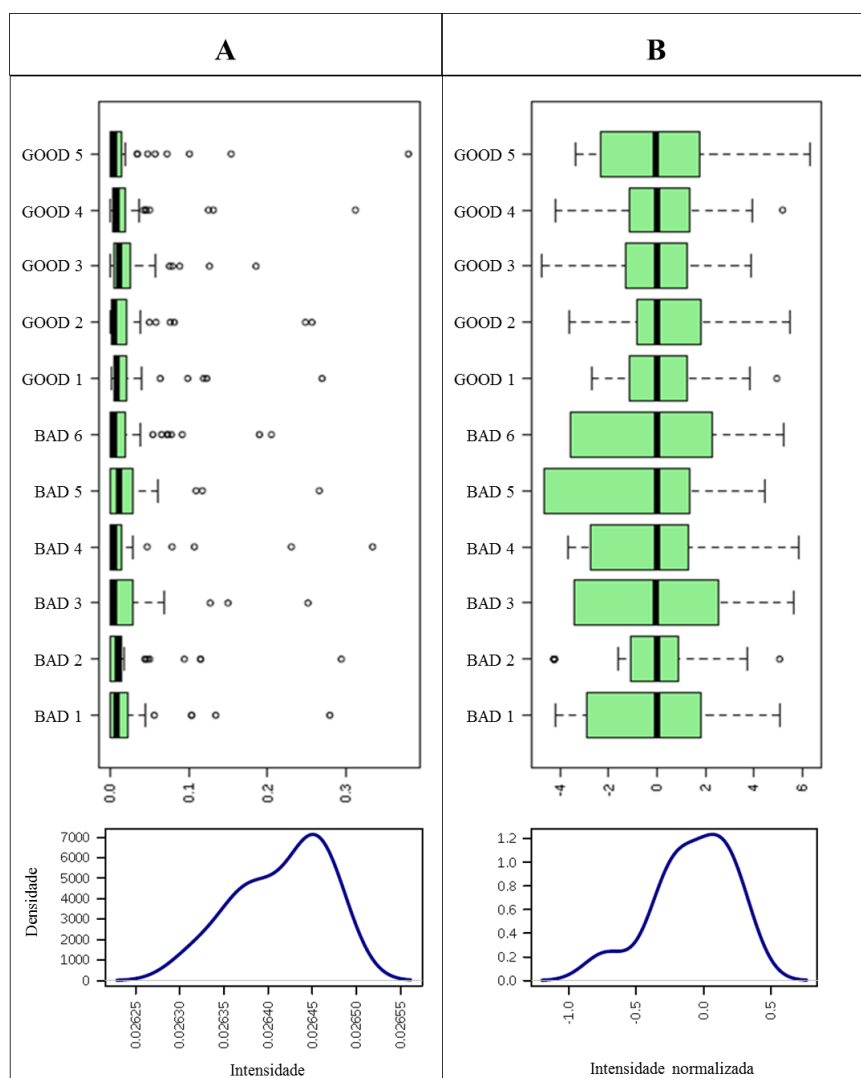


Fig. 4. Box plots and density plot points before (A) and after normalization (B) of the variables submitted to lipidomic analysis, in the Bad and Good groups. Sample median, row-wise and log normalization.

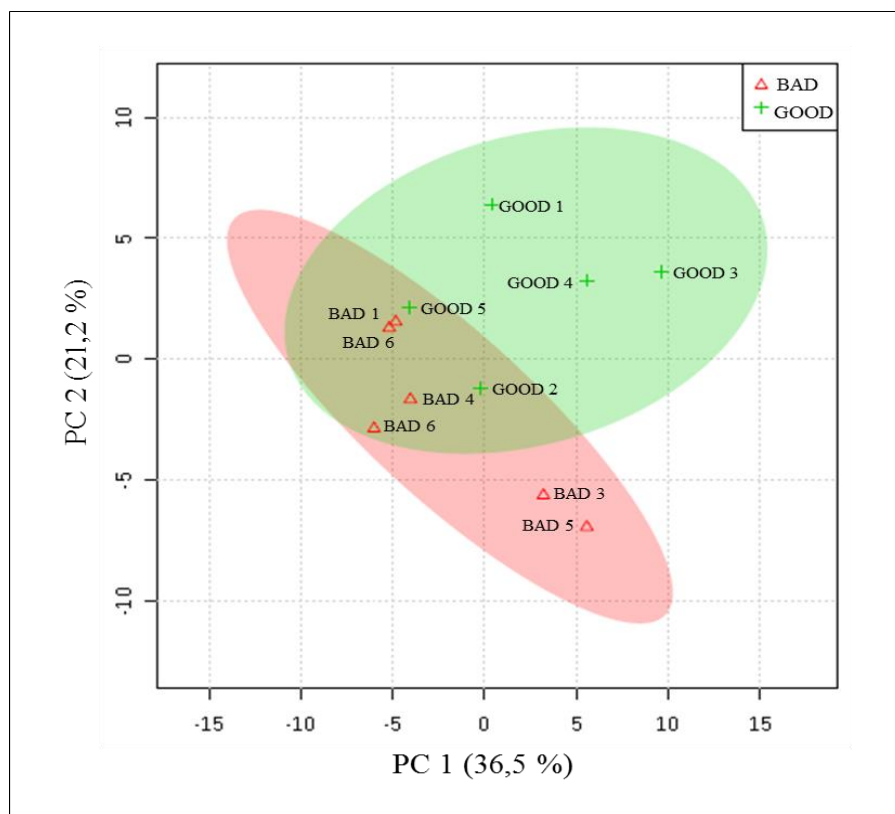


Fig. 5. Score plot of the multivariate analysis of the principal components analysis (PCA) PC1 and PC2 in the Bad and Good groups, which indicates the stallions that represent the variation between the groups (PC1 + PC2 = 57.7%).

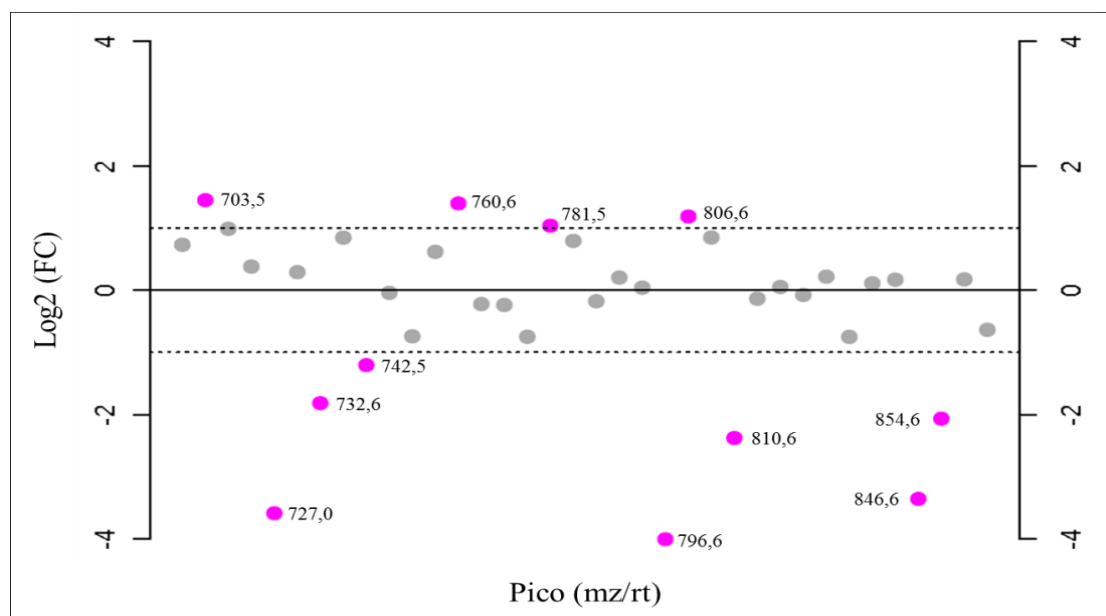


Fig. 6. Fold-change ions (m/z) comparing the absolute values of the mean changes in the Bad and Good groups, which were more (above the dotted line) or less (below the dotted line) abundant (pink circles). The threshold was considered 2 and the values were expressed in log scale.

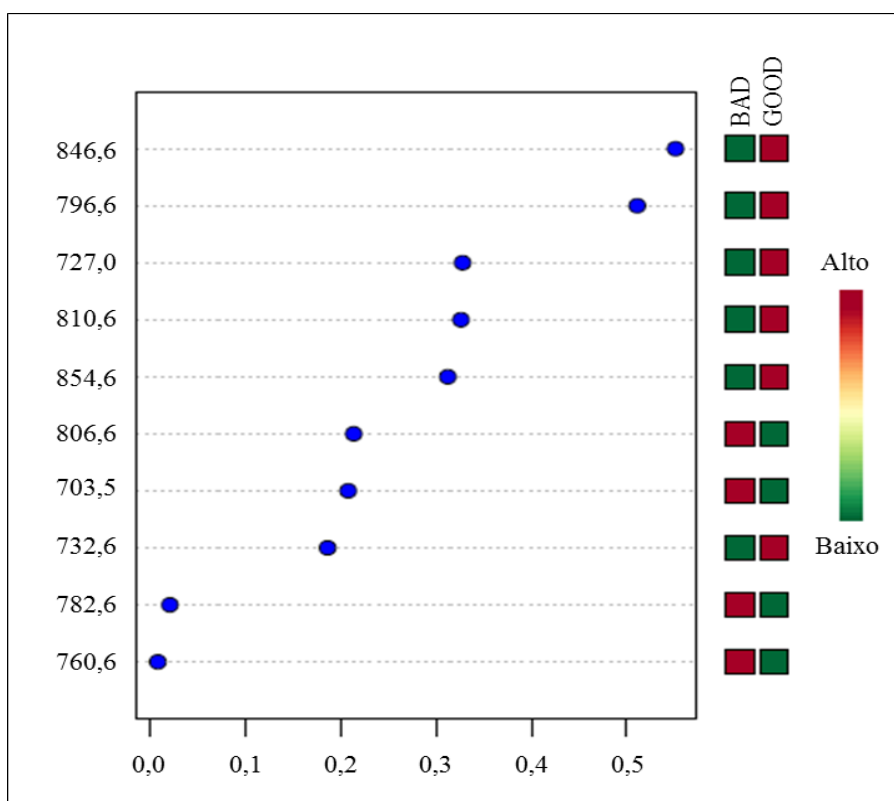


Fig. 7. Results of multivariate regression of type partial least squares - discriminant analysis (PLS-DA). The color boxes (right) indicate ion relative abundance in each group (Bad and Good).

Relative abundance the several ions were correlated with parameters of fresh and thawed sperm results (Table 4). The majority of the correlations were moderate or strong, 6 (703.5, 725.5, 812.6, 832.6, 836.6, 838.6) of which were the main, since they correlated to several parameters of fresh and frozen semen. Interestingly, 3 ions (832.6, 836.6, 838.6) were only correlated to the parameters from thawed sperm. Moreover, there was a moderate and strong correlation between lipid peroxidation and 2 ions (717.0 and 794.6, respectively). Similar results were observed to 2 ions (717.0 and 794.6) and plasma membrane integrity.

Table 4.

Correlation between relative abundance of lipidic ions and parameters of fresh and thawed sperm. Pearson coefficient (r) and *P* value.

	PARAM	700.6	703.5	717.0	725.5	728.6	748.0	760.6	781.5	792.6	794.6	812.6	828.0	830.6	832.6	836.6	838.6
FRESH	TM	--	--	--	0.61	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
		--	--	--	(0.05)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	VSL	--	-0.65	--	--	-0.67	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
		--	(0.03)	--	--	(0.02)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	VCL	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	-0.72	0.62	--	--	--	--
		--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	(0.01)	(0.04)	--	--	--	--
	WOB	--	--	--	0.67	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
		--	--	--	(0.03)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	RAP	--	-0.69	--	0.61	--	0.67	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
		--	(0.02)	--	(0.05)	--	(0.03)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
THAWED	CI	--	--	--	--	--	--	--	-0.71	--	--	--	--	--	--	--	--
		--	--	--	--	--	--	--	(0.01)	--	--	--	--	--	--	--	--
	TM	--	-0.81	--	0.69	--	--	--	--	--	--	0.68	--	--	0.75	0.62	0.67
		--	(<0.01)	--	(0.02)	--	--	--	--	--	--	(0.02)	--	--	(0.01)	(0.04)	(0.03)
	PM	--	-0.79	--	0.76	--	--	--	--	--	--	0.68	--	--	0.80	0.70	0.68
		--	(<0.01)	--	(0.01)	--	--	--	--	--	--	(0.02)	--	--	(<0.01)	(0.02)	(0.02)
	VAP	--	--	--	0.76	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.79	0.78	--
		--	--	--	(0.01)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	(<0.01)	(<0.01)	--
	VSD	--	--	--	--	--	--	-0.60	--	--	--	--	--	--	0.76	0.75	--
		--	--	--	--	--	--	(0.05)	--	--	--	--	--	--	(0.01)	(0.01)	--
	VCL	--	-0.64	--	0.78	--	--	--	--	--	--	0.64	--	--	0.80	0.76	--
		--	(0.03)	--	(<0.01)	--	--	--	--	--	--	(0.03)	--	--	(<0.01)	(0.01)	--
	WOB	0.77	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
		(0.01)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
	RAP	--	-0.76	--	0.77	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.81	0.72	0.67
		--	(0.01)	--	(0.01)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	(<0.01)	(0.01)	(0.02)
	CI	--	--	--	--	--	--	--	--	-0.62	--	--	--	--	--	--	--
		--	--	--	--	--	--	--	--	(0.04)	--	--	--	--	--	--	--
	PERO	--	--	-0.74	--	--	--	--	--	--	-0.62	--	--	--	--	--	--
		--	--	(0.01)	--	--	--	--	--	--	(0.04)	--	--	--	--	--	--

(--) Parameter and ion relative abundance not significantly correlated

4. Discussion

Semen freezing process induces significant biophysical and biochemical changes in the spermatozoa, including modifications of membrane and its components. Thereby,

lipid composition of sperm membrane constitutes an important factor in cryopreservation since its membrane integrity is altered during this process [12, 32]. In the present study, we investigated the relationship between the lipids of the sperm cell and the sperm parameters after thawing of equine semen.

In general, animals classified as freezing resistant (Good group) had a higher relative abundance of phosphatidylcholines, represented by m/z 846.6, 727.0, 810.6 and 854.6. While in the Bad group only the ion 782.6 of this same class presented greater relative abundance.

In a study conducted by Lessig et al. [33] a higher abundance of phosphatidylcholines was also detected, followed by sphingomyelins in human and swine sperm membranes. Although phosphatidylcholines constitute the greater lipid fraction present in the cell membrane, around 23.2% in equine spermatozoa [9], the high detection of these phospholipids can also be due to a permanent positive charge in this lipid classes with quaternary ammonia groups [25], since MALDI-TOF MS was conducted using positive mode.

The positive correlation between lipids abundance (phosphatidylcholines) and the sperm kinetics in thawed spermatozoa was mentioned by Parks and Lynchy [12], which found higher proportion of phosphatidylcholine: phosphatidylethanolamine in sperm membrane of boar, bull and stallion with greater resistance to cryopreservation when compared to the spermatozoon of rooster. Moreover, the addition of phosphatidylcholine in extender prevented epididymis sperm to suffer structural damage induced by cold shock and maintained the motility and oxygen consumption similar to ejaculated boar spermatozoa, which were more resistant to cold shock than those from the epididymis [13].

During cryopreservation the sperm cells are subjected to several injuries, and is

presumable that phosphatidylcholine content in sperm membrane is modified, which can compromise the sperm function, since the phospholipids are associated with the acrosomal reaction [34]. Furthermore, during ejaculation there is the interaction between choline residues of membrane phospholipids with equine seminal plasma proteins, which stimulates the efflux of cholesterol and phospholipids through the molecules involved in sperm capacitation, such as heparin [35, 36]. Alterations in the lipid composition membrane could impair this process.

Other ion abundantly found in the animals from Good group was m/z 796.6, represented by the plasmalogen phosphatidylcholine [24]. Plasmalogens are characterized to have an ether linkage at carbon 1 or 2 of the glycerol molecule, generally combined with PUFAs and are associated with cellular protection against oxidative stress [37], mainly docosahexanoic acid (C22: 6n-3) and docosapentanoic acid [38,39]. This lipid in greater abundance in Good group confer decrease oxidative stress and increased sperm parameters after cryopreservation.

The PUFAs are directly related to the fusion of the oocyte and with the fertilizing capacity. In stallions, the addition of docosahexanoic acid (22: 6 n-3) in the diet showed improvement in the quality of sperm parameters in cooled and frozen-thawed semen [40-41], reviewed by Arruda et al. [42].

The higher abundance of sphingomyelin represented by the m/z 703.5 ion present in Bad animals and their negative correlation with sperm motility after thawing can be justified by the absence of double bond fatty acids in their molecular structure. The relationship of these lipids with lower membrane integrity is possibly due to the presence of saturated fatty acids, which are associated with higher membrane stiffness [11, 43]. Other authors mention that sphingomyelins may be associated with the induction of apoptosis and generation of ceramides [44,45].

Although phosphatidylethanolamines were found to be more abundant in the sperm membranes of stallions resistant to freezing (unpublished data RAMIRES NETO, 2015) and their higher concentration had a positive correlation with the reproductive period in broilers [5], in the present study (represented by ion m/z 760.6) were more abundant in the Bad group, whose intolerance to the freezing process was probably due to the degree of saturation of the fatty acids of this lipid. According to Nissen and Kreysel [46] PUFAs are positively correlated with sperm motility.

Phosphatidylethanolamines, lipid class formed by the enzymatic reaction of ethanolamine with phosphatidylserine, is involved in the modulation of the activity of receptors, ion channels, enzymes, signaling molecules and regulation of membrane fluidity, among other functions [47]. Ethanolamines, as well as colines and seminolipids, are usually combined with polyunsaturated fatty acids and, although the PUFAS are associated with membrane fluidity, they make spermatozoa even more prone to the oxidative process, since when they oxidize the chains they produce new oxidizing metabolites increasing cell damage [48].

In the study of the lipid composition of the female follicular environment, phosphatidylethanolamines were present in non-pregnant females after *in vitro* fertilization [49]. According to Post et al. [50] when membrane destabilization occurs, phosphatidylethanolamines is redistributed and exposed to the cellular environment signaling cell death. Therefore, it is plausible that the greater abundance of this lipid in the Bad group is associated to a possible apoptosis process of the post-thawed sperm cells.

Phosphatidic acid plays a key role in lipid metabolism, since it is an essential substrate for the enzymes involved in glycerophospholipid and triacylglycerol biosynthesis [51] and is involved in cell signaling and membrane transport. Thus, its negative correlation (represented by ion m/z 717.5) with the lipid peroxidation, suggests that this lipid may be

associated with increased sperm resistance to cryopreservation process. In rats, it has been shown that its acid phosphatidic enzyme, phospholipase A1 apparently regulates the organization of mitochondria during spermatogenesis, in which their deficiency causes loss of motility due to the modification of their flagellum and high levels generate defects in sperm formation [52].

Based on these results, we can conclude that lipid composition of equine semen influence the sperm quality and some can interfere positively and others negatively in sperm kinetics, membrane structure and lipid peroxidation.

References

- [1] Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci* 2005;89:105-13.
- [2] Vidament M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci* 2005;89:115-36.
- [3] Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000;53:47-58.
- [4] Am-In N, Kirkwood RN, Tecchakumphu M, Tantasuparuk W. Lipids profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology* 2011;75:897-903.
- [5] Cerolini S, Keslo KA, Noble RC, Speake BK, Pizzi F, Cavalchini LG.

- Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biol Reprod* 1997;57:976-80.
- [6] Wood PL, Scoggin K, Ball BA, Troedsson MH, Squires EL. Lipidomics of equine sperm and seminal plasma: Identification of amphiphilic (O-acyl)- ω -hydroxy-fatty acids. *Theriogenology* 2016;86:1212-21.
- [7] Naoko-Goto-Inoue N, Hayasaka T, Zaima N, Setou M. The specific localization of seminolipid molecular species on mouse testis during testicular maturation revealed by imaging mass spectrometry. *Glycobiology* 2009;19:950-7.
- [8] Schiller J, Arnhold J, Glander HJ, Arnold K. Lipids analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy – effects of freezing and thawing. *Chem Phys Lipids* 2000;106:145-56.
- [9] Gadella BM, Rathi R, Bevers MM, Brouwers JFHM, Neild D, et al. The role of lipid dynamics in equine sperm plasma membrane function. *Havemeyer Found Monogr Ser* 2001;5:24.
- [10] Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J Androl* 1990;11:73-88.
- [11] Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000;1469:197-235.

- [12] Parks JE, Lynch DV. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membrane. *Cryobiology* 1992;29:255-66.
- [13] Simpson AM, Swan MA, White IG. Susceptibility of epididymal boar sperm to cold shock and protective action of phosphatidylcholine. *Gamete Res* 1987;17:355-73.
- [14] Gorgas K, Teigler A, Komljenovic D, Just WW. The ether lipid-deficient mouse: Tracking down plasmalogen functions. *Biochim Biophys Acta* 2006;1763:1511-26.
- [15] Aksoy Y, Aksoy H, Altinkaynak K, Aydin HR, Özkan A. Sperm fatty acid composition in subfertile men. *Prostaglandins Luekot Essent Fatty Acids*. 2006;75:75-9.
- [16] Zalata AA, Christophe AB, Depuydt E, Schoonjans F, Comhaire FH. The fatty acid composition of phospholipids of spermatozoa from infertile patients. *Mol Hum Reprod* 1998;4:111-8.
- [17] Dell'Aqua JA, Papa FO, Alvarenga MA, Zahn FS. Effect of centrifugation and packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci* 2001;68:324-5.
- [18] Papa FO, Zahn FS, Dell'aqua Jr JA, Alvarenga MA. Utilização do diluente MP50

para a criopreservação do sêmen equino. *Rev Bras Reprod Anim* 2002;26:184-7.

- [19] Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988;38:1171-80.
- [20] Guasti PN, Freitas-Dell'aqua CP, Maziero RRD, Hartwig FP, Monteiro GA, Lisboa FP, et al. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. *Anim Reprod* 2012;9:929.
- [21] Bligh EG, Dyer JW. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochim Can J Physiol* 1959;37:911-7.
- [22] Xia J, Wishart DS. Using MetaboAnalyst 3.0 for Comprehensive metabolomics data analysis. *Curr Protocon Bioinform* 2016;55:14.10.1-91.
- [23] Levine DM, Stephan DF, Krehbiel TC, Berenson ML. *Estatística: teoria e aplicações*. 6th ed. Rio de Janeiro: LTC; 2013.
- [24] Milne S, Ivanova P, Forrester J, Alex Brown H. Lipidomics: an analysis of cellular lipids by ESI-MS. *Methods* 2006;39:92-103.
- [25] Petkovic M, Schiller J, Muller M, Bernard S, Reichl S, Arnold K, et al. Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: phosphatidylcholine prevents the detection of further species *Anal Biochem* 2001;289:202-6.

- [26] Ferreira CR, Saraiva AS, Catharino RR, Garcia JS, Gozzo FC, Sanvido GB, et al. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *J Lipid Res* 2010;51:1218-27.
- [27] Brugger B, Erben G, Sandhoff R, Wieland FT, Lehmann WD. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2339-44.
- [28] Schiller J, Müller K, Süß R, Arnhold J, Gey C, Herrmann A, et al. Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry—a cautionary note. *Chem Phys Lipids* 2003;126:85-94.
- [29] Tata A, Sudano MJ, Santos VG, Landim-Alvarenga FD, Ferreira CR, Eberlin MN. Optimal single-embryo mass spectrometry fingerprinting. *J Mass Spectrom* 2013;48:844-9.
- [30] Saraiva SA, Cabral EC, Eberlin MN, Catharino RR. Amazonian vegetable oils and fats: Fast typification and quality control via triacylglycerol (TAG) profiles from bry matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) Mass spectrometry fingerprinting. *J Agric Food Chem* 2009;57:4030-4.
- [31] Fuchs B, Jakop U, Göritz F, Hermes R, Hildebrandt T, Schiller J, et al. MALDI-TOF "fingerprint" phospholipid mass spectra allow the differentiation between ruminantia and feloideae spermatozoa. *Theriogenology* 2009;71:568-75.

- [32] Pettit MJ, Buhr MM. Extender components and surfactants affect boar sperm function and membrane behaviour during cryopreservation. *J Androl* 1998;19:736-46.
- [33] Lessig J, Gey C, Suß R, Schiller J, Glander HJ, Arnhold J. Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALD-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and ³¹P NMR spectroscopy. *Comp Biochem Physiol B* 2004;137:265-77.
- [34] Cross NL. Phosphatidylcholine enhances the acrosomal responsiveness of human sperm. *J Androl* 1994;15:484-8.
- [35] Ekhlasi-Hundrieser M, Schäfer B, Kirchhoff C, Hess O, Bellair S, Müller P, et al. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. *Mol Reprod Dev* 2005;70:45-57.
- [36] Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol* 2002;53:109-19.
- [37] Khaselev N, Murphy R. Structural characterization of oxidized phospholipid products derived from arachidonate-containing plasmenyl glycerophosphocholine. *J Lipid Res* 2000;41:564-72.
- [38] Nagan N, Zoeller RA. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res*

2001;40:199-229. Disponível em: <[http://doi:10.1016/S0163-7827\(01\)00003-0](http://doi:10.1016/S0163-7827(01)00003-0)>.

Acesso em: 10 jun. 2016.

- [39] García BM, Fernandez LG, Ferrusola CO, Bolanos JMG, Martinez HR, Tapia JA, et al. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2011;75:811-8.
- [40] Brinsko SP, Varner DD, Love CC, Blanchard TL, Day BC, Wilson ME. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology* 2005;63:1519-27.
- [41] Elhordoy DM, Cazales N, Costa G, Estevez J. Effect of dietary supplementation with DHA on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Anim Reprod Sci* 2008;107:319.
- [42] Arruda RP, Silva DF, Alonso MA, De Andrade AFC, Nascimento J, Gallego AM, et al. Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions. *Rev Bras Zootec* 2010;39:393-400.
- [43] Lenzi A, Picardo M, Gandini L, Donodero F. Lipids of the sperm plasma membranes: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update* 1996;2:246-56.
- [44] Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, et al.

- Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos Tauru Taurus* in-vitro and in vivo-produced blastocysts. *Biol Reprod* 2012;87:1-11.
- [45] Kalo D, Roth Z. Involvement of the sphingolipid ceramide in heat-shock-induced apoptosis of bovine oocytes. *Reprod Fertil Dev* 2011;23:876-88.
- [46] Nissen HP, Kreysel HW. Polyunsaturated fatty acids in relation to sperm motility. *Andrologia* 1983;15:264-269.
- [47] Christie WW. Lipidomics: a personal view, <http://lipidlibrary.aocs.org/topics/lipidomics/index.htm>; 2016. [accessed 20.06.16].
- [48] Bansal AK, Bilaspuri GS. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. *Vet Med Int* 2010;2011:1-7, [http: doi:10.4061/2011/686137](http://doi:10.4061/2011/686137). [accessed 20.12.16].
- [49] Montani DA, Cordeiro FB, Cataldi TR, Victorino AB, Pilau EJ, Gozzo FC, et al. The follicular microenvironment as a predictor of pregnancy: MALDI-TOF MS lipid profile of cumulus cells. *J Assist Reprod Genet* 2012;29:1289-97.
- [50] Post JA, Bijvelt JJ, Aj V. Phosphatidylethanolamine and sarcolemal damage during ischemia or metabolic inhibition of heart myocytes. *Am J Physiol* 1995;268:H773-80.

- [51] Athensthaedt K, Daum G. Phosphatidic acid, a Key intermediate in lipid metabolism. *Eur J Biochem* 1999;266:1-16./55

- [52] Baba T, Kashiwagi Y, Arimitsu N, Kogure T, Edo A, Maruyama T, et al. Phosphatidic acid (PA)-preferring phospholipase A1 regulates mitochondrial dynamics. *J Biol Chem* 2014;289:11497-511./56

CAPÍTULO 3

CONCLUSÕES GERAIS

Baseado nos resultados do presente experimento pode-se concluir que a composição lipídica do sêmen equino influencia na qualidade espermática de acordo com sua abundância relativa, sendo que alguns podem interferir positivamente e outros negativamente na cinética espermática, na estrutura da membrana e na peroxidação lipídica.

ANEXOS

Link das normas para submissão à revista Theriogenology

<http://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>