

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

**PERFIL LIPÍDICO DA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA DE
ESPERMATOZOIDES “IN NATURA” E CRIOPRESERVADOS DE
JUMENTOS E CAVALOS**

MARIA MANOELA BARATA DE CASTRO CHAVES

Botucatu-SP

Agosto 2015

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

**PERFIL LIPÍDICO DA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA DE
ESPERMATOZOIDES “IN NATURA” E CRIOPRESERVADOS DE
JUMENTOS E CAVALOS**

MARIA MANOELA BARATA DE CASTRO CHAVES

Tese apresentada ao programa de
Pós-graduação em Biotecnologia
Animal para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Dell’Aqua Júnior

Botucatu-SP

Agosto 2015

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-CRE 8/7500

Chaves, Maria Manoela Barata de Castro.

Perfil lipídico da membrana citoplasmática de espermatozoide "in natura" e criopreservados de jumentos e cavalos / Maria Manoela Barata de Castro Chaves. - Botucatu, 2015

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

Orientador: José Antonio Dell'Aqua Junior

Capes: 50504002

1. Equino - Reprodução. 2. Asinino - Reprodução. 3. Lipídios. 4. Criopreservação. 5. Preservação do sêmen. 6. Proteínas de choque térmico. 7. Biotecnologia animal.

Palavras-chave: choque térmico; lipídeo; membrana plasmática; preservação; sêmen.

NOME DO AUTOR: Maria Manoela Barata de Castro Chaves

TÍTULO: Perfil lipídico da membrana citoplasmática de espermatozoides “~~ni~~ natural” e criopreservados de jumentos e cavalos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.Dr. José Antônio Dell’Aqua Júnior (Presidente e Orientador)

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Tit. Frederico Ozanam Papa (Membro)

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Tit. Rubens Paes de Arruda (Membro)

Departamento de Reprodução Animal

FMVZ – USP - Pirassununga

Prof. Dr. André Maciel Crespilho (Membro)

Departamento de Reprodução Animal

Universidade de Santo Amaro

Prof. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP - Botucatu

DATA DA DEFESA: 26 de agosto de 2015

DEDICATÓRIA

À minha mãe.....

Ana Maria Barata, por todos os momentos difíceis que
passei durante essa fase da minha vida. Seu Amor foi
fundamental para a conclusão desse curso.

Te Amo!!!

AGRADECIMENTOS

Ao meu amigo de pós graduação Carlos Ramires Neto por toda a ajuda, compreensão e apoio durante todo o curso. Você foi fundamental para a conclusão desse trabalho. Obrigada Carlinhos!

Aos pós graduandos do Laboratório ThoMSon de Espectometria de Massa da Unicamp, pela parceria para realização do experimento. Especialmente ao Professor Marcos Eberlin, a Dra. Alessandra, a Dra. Dávila e a Dra. Katia Roberta, por todas análises de MALDI-MS.

Ao Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Júnior pela orientação e dedicação, e principalmente por toda compreensão.

À Dra. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua pelas análises realizadas durante o experimento e pela ajuda na finalização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Mateus Sudano pelas análises estatísticas, pela dedicação e contribuição neste trabalho.

Ao Prof. Tit. Frederico Ozanam Papa pela sua contribuição e ensinamentos ao longo do curso. Por todo conhecimento transmitido desde o meu Mestrado.

À Dra. Fabiana Ferreira de Souza, pelas colaborações e correções da qualificação e defesa. Sua dedicação contribui muito para o trabalho. Obrigada.

À banca examinadora: Professor Rubens Paes de Arruda, Professor Frederico Ozanam Papa, Professora Fabiana Ferreira de Souza, Professor André Maciel Crespilho e ao Professor José Antônio Dell'Aqua Júnior.

À empresa Botupharma, por disponibilizar parte dos produtos utilizados nesse trabalho.

À todos os Jumentos e Garanhões utilizados nesse estudo, bem como seus proprietários e veterinários.

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

Ao Cnpq pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPESP pelo apoio ao projeto de pesquisa (processo 2013/12838-9).

Aos funcionários do Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária.

E em especial ao Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga por todos os ensinamentos profissionais e experiências pessoais. Você contribuiu muito para a minha formação profissional. Obrigada!!

Lista de Abreviações

ANE V : Células íntegras com translocação de fosfatidilserina;

CASA: análise computadorizada do movimento espermático;

CFDA: Diacetato de carboxifluoresceína;

DIC: Microscopia de contraste de interferência diferencial;

DNA: Ácido Desoxiribonucléico;

FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia;

IMP: integridade de membrana plasmática;

IP: Iodeto de propídio;

MALDI-MS: *matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry* mL: mililitro;

MP: motilidade progressiva;

MT: motilidade total;

PBS: soro fetal bovino;

PERO: Índice de peroxidação lipídica;

RAP: espermatozoides rápidos;

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio;

ROS T: Espécies Reativas de Oxigênio em todas as células;

ROS CI: Espécies Reativas de Oxigênio em células íntegras;

VAP: velocidade média de trajeto;

VSL: velocidade linear progressiva;

v/v: volume por volume;

µL: microlitro;

µm/s: micrômetro por segundo;

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1: Configuração do equipamento de CASA utilizado nas análises. 39

Tabela 2: Valores médios e desvios padrão da cinética espermática e da integridade da membrana plasmática do sêmen de jumentos e cavalos a fresco. 42

Tabela 3: Valores da quantidade total de íons, íons exclusivos de cada espécie, íons com maior abundância comuns, íons identificados e íons não identificados nos espermatozoides a fresco de cavalos e jumentos. 43

Tabela 4: Valores dos lipídeos de maior abundancia relativa em relação a massa-carga (m/z), fórmula molecular (Fosfolipídios), referência bibliográfica da identificação do íon (Referência) de espermatozoides a fresco de cavalos e jumentos. 46

Artigo 2

Tabela 1: Configuração do equipamento de CASA utilizado nas análises. 60

Tabela 2: Valores médios e desvios padrão da cinética espermática e da integridade da membrana plasmática do sêmen fresco e refrigerado a 5°C por 24 horas de jumentos. 63

Tabela 3: Valores médios e desvios padrão da cinética espermática e da integridade da membrana plasmática do sêmen fresco e descongelado (Descong) de jumentos.

64

Tabela 4: Valores da quantidade total de íons lipídicos, íons exclusivos de cada grupo, íons com maior abundância comuns aos grupos, íons identificados e íons não identificados, encontrados nos espermatozoides a fresco e refrigerados a 5°C por 24 horas de jumentos.

65

Tabela 5: Valores dos lipídeos de maior abundancia relativa em relação a massa-carga (m/z), fórmula molecular (Fosfolipídios), referência bibliográfica da identificação do íon (Referência) de espermatozoides a fresco e refrigerados a 5°C por 24 de jumentos.

70

Tabela 6: Valores da quantidade total de íons lipídicos, íons exclusivos de cada grupo, íons com maior abundância comuns aos grupos, íons identificados e íons não identificados, encontrados nos espermatozoides de jumentos a fresco e após a descongelação.

72

Tabela 7: Valores dos lipídeos de maior abundancia relativa em relação a massa-carga (m/z), fórmula molecular (Fosfolipídios), referência bibliográfica da identificação do íon (Referência) de espermatozoides a fresco e após a descongelação do sêmen de jumentos.

76

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1: Exemplos representativos de espectros de massas dos perfis de fosfolipídeos obtidos dos cavalos e jumentos.

42

Figura 2: Representação gráfica da diferença do perfil de fosfolipídeos, analisado por PLS-DA, entre os grupos Cavalos e Jumentos.

43

Figura 3: Representação gráfica dos íons lipídicos que apresentaram maior abundância relativa na membrana espermática de cavalos em relação aos de jumentos.

44

Figura 4: Representação gráfica dos íons lipídicos que apresentaram maior abundância relativa na membrana espermática de jumentos em relação aos de cavalos.

45

ARTIGO 2

Figura 1: Exemplos representativos de espectros de massas dos perfis de fosfolipídeos da membrana espermática do sêmen fresco e refrigerado a 5°C por 24 horas.

65

Figura 2: Representação gráfica da diferença do perfil de fosfolipídeos, analisado por PLS-DA, entre os momentos antes e após a refrigeração (5°C

por 24 horas) do sêmen de jumentos
66

Figura 3a: Representação gráfica dos íons lipídicos de massa carga que apresentaram maior abundância relativa antes da refrigeração a 5°C por 24 horas nos espermatozoides de jumentos.
67

Figura 3b: Representação gráfica dos íons lipídicos de massa carga que apresentaram maior abundância relativa antes da refrigeração a 5°C por 24 horas nos espermatozoides de jumentos.
68

Figura 4: Representação gráfica da diferença na abundância relativa dos íons lipídicos que aumentaram após a refrigeração a 5°C por 24 horas nos espermatozoides de jumentos.
69

Figura 5: Exemplos representativos de espectros de massas dos perfis de fosfolipídios da membrana espermática do sêmen fresco e descongelado.
73

Figura 6: Representação gráfica da diferença do perfil de fosfolipídeos, analisado por PLS–DA, entre os momentos antes e após a congelação do sêmen de jumentos.
74

Figura 7: Pontuação VIP identificando os íons lipídicos que apresentaram maior discrepância entre os momentos avaliados sêmen fresco e descongelado de jumentos.
75

Figura 8: Representação gráfica dos íons lipídicos que apresentaram maior abundância relativa antes e após a congelação do sêmen de jumentos.
76

SUMÁRIO

Capítulo 1	
Introdução-	03
Revisão de literatura-	15
Referências -	28
Hipótese-	35
Objetivo	35
Capítulo 2 – Artigo científico 1	36
Comparação do perfil lipídico do espermatozoide de jumentos (<i>Equus asinus</i>) e cavalos (<i>Equus caballus</i>)-	
Capítulo 3 – Artigo científico 2	57
Alterações do perfil lipídico dos espermatozoides de jumento (<i>Eqqus Asinus</i>) durante a criopreservação -	
Capítulo 4	89
Conclusões Gerais -	
Anexos -	90

RESUMO

CASTRO CHAVES, M. M. B. **Perfil lipídico da membrana citoplasmática de espermatozoides “*in natura*” e criopreservados de jumentos e cavalos**. Botucatu, 2015 90p, Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

Os equinos e asininos pertencem à família Equidae e gênero *Equus*, por este motivo são considerados similares e tratados de forma equivalente em relação à fisiologia reprodutiva. A membrana plasmática do espermatozoide funciona como uma barreira física ao ambiente externo e a sua integridade estrutural está diretamente relacionada ao tipo e quantidade de lipídios que a compõem. Desta forma, este estudo teve como objetivos comparar perfil lipídico dos espermatozoides de jumentos e cavalos e comparar o perfil lipídico da membrana dos espermatozoides de jumentos antes e após os processos de criopreservação. No Experimento 1 comparamos o perfil lipídico da membrana espermática de jumentos e cavalos e foram identificados 101 íons lipídicos em cavalos e 105 em jumentos. Os asininos apresentaram maior abundância relativa em 18 íons. No Experimento 2 foram avaliadas as alterações do perfil lipídico da membrana espermática de jumentos durante o processo de criopreservação e observou-se perda de 14 íons lipídicos e 16 novos íons surgiram após os processos de criopreservação. De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que a composição lipídica da membrana do espermatozoide de jumentos é diferente de cavalos e os processos de criopreservação levam a alterações na composição de fosfolipídeos da membrana plasmática de espermatozoides de jumentos.

Palavras-chave: sêmen, lipídeo, criopreservação, choque térmico, membrana plasmática.

ABSTRACT

CASTRO CHAVES, M.M.B. **Lipid profile of membrane sperm cytoplasmic “in natura” and cryopreserved of donkeys and horses.** Botucatu , 2015 90p , Tese (PhD) . Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Universidade Estadual Paulista.

The horses and donkeys belong to the Equidae family and genus Equus, for this reason are considered similar and treated equivalently with respect to reproductive physiology. The plasma membrane of the sperm works as a physical barrier to the external environment and its structural integrity is directly related to the type and quantity of lipids that comprise it. Thus, this study aimed to compare the lipid profile of sperm donkeys and horses and compare the lipid membrane of the donkey sperm before and after cryopreservation processes. In Experiment 1 compared the lipid profile of the donkeys and horses sperm membrane and 101 lipid ions were identified in horses and 105 donkeys in. The donkeys had higher relative abundance in 18 ions. In Experiment 2 were evaluated changes in the lipid profile of the donkeys sperm membrane during the cryopreservation process and there was loss of 14 lipid ions and 16 new lipid ions arose after the cryopreservation processes. According to the obtained results we can conclude that the lipid composition of donkey sperm membrane is different from horses and cryopreservation processes lead to changes in the phospholipid composition of the plasma membrane of sperm donkeys.

Keywords: sperm, lipid, cryopreservation, cold shock, plasma membrane.

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

O jumento Pêga é uma raça asinina nacional que apresenta 200 anos de evolução e seleção. Surgiu do cruzamento entre raças italiana e egípcia (Nunes, 2007). No Brasil são aproximadamente 16 mil animais registrados e 1.700 criadores.

Asininos são criados em muitos países com interesse em preservar a espécie que é considerada em extinção (Itália, Espanha, França e Inglaterra), e são utilizados em todo mundo como animal de guarda para proteger pequenos ruminantes (Pugh, 2002). No Brasil a criação de jumentos destina-se, principalmente, a produção de muares. Os híbridos são muito valorizados em áreas rurais pela sua grande resistência a doenças, força física e agilidade. São muito utilizados em atividades como a de lida com gado de corte em grandes fazendas no centro-oeste do Brasil, como animal de transporte e tração.

Os jumentos pertencem ao mesmo grupo taxonômico que os cavalos, sendo considerados similares e tratados de forma equivalente em relação à fisiologia reprodutiva. Porém, vários trabalhos já comprovaram particularidades da espécie quanto as características seminais (Costa et al., 1991; Gastal et al., 1997), comportamento sexual (Gastal et al., 1991; Henry, 1991; Morais et al., 1993; McDonnell, 1998) e a criopreservação de sêmen (Mello et al., 2000; Oliveira et al., 2006; Rota et al., 2008).

A criopreservação de sêmen é uma biotecnologia que permite a maximização do potencial genético do reprodutor produzindo maior número de descendentes. Possibilita o armazenamento do material genético, reduz os custos com transporte e aumenta o controle de doenças sexualmente transmissíveis (Squires et al., 1999). Apesar de tantas vantagens, a utilização de sêmen congelado reduz a fertilidade pela diminuição da viabilidade da célula espermática durante o processo (Watson, 2000).

Devido à complexa função do espermatozoide, a membrana plasmática é uma estrutura altamente especializada, tendo papel importante na proteção do material genético e na fertilização (Lenzi et al., 1996). Composta por uma bicamada de fosfolípidos e proteínas, a membrana

espermática regula funções específicas como a capacitação espermática, a reação acrossomal e a ligação entre espermatozoide e ovócito (Hall, Hadley e Doman, 1991).

A organização da membrana plasmática dos espermatozoides segue o modelo —mosaico fluido” onde moléculas de lipídeo e proteína movem-se lateralmente no plano da bicamada. E essa mobilidade lateral dos fosfolipídeos é conferida pela característica de fluidez da membrana na temperatura corpórea.

O fosfolipídeo é o principal constituinte que confere a característica de fluidez da membrana, a qual depende da composição e da temperatura. A mudança de estado fluido para gel em membranas com maior proporção de lipídeos de cadeia insaturada ocorre em temperaturas menores (Albert et al., 1997).

A composição dos ácidos graxos e a proporção dos lipídeos que compõem a membrana plasmática dos espermatozoides estão diretamente relacionadas à sua resistência a criopreservação (Parks e Lych, 1992). Sendo importante conhecer a composição lipídica da membrana plasmática para estabelecer metodologias de manutenção da sua integridade durante os processos de criopreservação. Entretanto, existem poucos estudos da composição lipídica da membrana de espermatozoides e nenhuma publicação na espécie asinina.

Nesse sentido, os objetivos deste trabalho foram comparar o perfil lipídico da membrana dos espermatozoides de jumentos e cavalos e comparar o perfil lipídico dos espermatozoides de jumentos após os processos de criopreservação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A célula espermática

O espermatozoide é uma célula haploide altamente especializada cuja estrutura é fundamental para o seu desempenho funcional. Desde a produção nos túbulos seminíferos até a fertilização do ovócito, o espermatozoide passa por meios adversos e tem que garantir a integridade da célula para que o material genético seja transmitido (Amann e Graham, 2010).

A fertilização do ovócito depende de cinco atributos desenvolvidos e mantidos pelo espermatozoide: metabolismo para produzir energia; motilidade progressiva; enzimas acrossomais; adequada distribuição de lipídios na membrana plasmática para estabilizar as estruturas e permitir a fusão das membranas no momento adequado; e proteínas da membrana plasmática essenciais para a sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea (Amann e Pickett, 1987).

O espermatozoide é dividido em três regiões: cabeça, peça intermediária e flagelo. A cabeça é composta pelo envelope nuclear que acomoda a cromatina altamente condensada, o acrossoma e a membrana plasmática. Apresenta também quatro regiões diferenciadas pela composição da membrana plasmática, sendo área apical, pré-equatorial, equatorial e pós-equatorial (Gadella, 2008). O formato e o tamanho da cabeça variam de espécie para espécie e é determinado pelo formato do núcleo. Em humanos a cabeça do espermatozoide apresenta comprimento de 4,5 μm , 5,9 μm em cães, 6,8 μm em bovinos, 8,5 μm em suínos e a cabeça espermática do equino tem 7,0 μm de comprimento (Meyers, 2009; Garner e Hafez, 2004).

O flagelo é dividido em quatro segmentos: colo ou pescoço que conecta a cauda a cabeça; peça intermediária que contém mitocôndrias responsáveis pela produção de energia necessária para a movimentação espermática; peça principal; e peça terminal (Meyers, 2009).

A maior função da mitocôndria é a produção de energia para a célula e a segunda maior função é regular a morte celular (Ott et al., 2007). Essa organela é a maior fonte de espécies reativas de oxigênio (ROS) e tem sido

identificada como a estrutura do espermatozoide mais sensível ao processo de criopreservação (Peña et al., 2006).

A célula espermática apresenta compartimentos especializados necessários para atravessar o trato reprodutivo feminino e fertilizar o ovócito. Estes compartimentos incluem a membrana plasmática, o núcleo, o acrossoma, o colo, as mitocôndrias e o axonema (Figura 1). Cada um tem uma função específica determinada pelas classes moleculares que os formam, como lipídios e proteínas. Todos os compartimentos intracelulares são delimitados por uma membrana que tem distinta composição lipídica e proteica, o que caracteriza cada compartimento (Amann e Graham, 2010).

2.1.1 Estrutura da membrana plasmática do espermatozoide

A membrana plasmática é a estrutura que delimita a célula sendo fundamental para a maioria dos fenômenos celulares, pois funciona como barreira seletiva determinando a composição do citoplasma celular. O modelo básico das membranas biológicas é a estrutura de bicamada de fosfolípidos com proteínas associadas (Singer e Nicolson, 1972).

Devido à complexa função do espermatozoide, a membrana plasmática é uma estrutura altamente especializada, tendo papel importante na proteção do material genético e na fertilização (Lenzi et al., 1996). Apesar de envolver toda a célula espermática a membrana plasmática apresenta composição distinta em determinadas regiões: nas regiões da porção rostral e caudal da cabeça, na peça intermediária e na peça principal. Envolve todo o espermatozoide, com espessura de 7,5 a 10 nm, flexível, seletiva e permeável aos solutos polares. Formada por três zonas: a bicamada lipídica, a superfície de contato entre os fosfolípidos e a água e o glicocálice. A bicamada é formada por fosfolípidos polares com porção hidrofílica voltada para face externa e porção hidrofóbica orientada em direção ao centro da bicamada (Singer e Nicolson, 1972; Amann e Pickett, 1987).

A organização da membrana plasmática dos espermatozoides segue o modelo “mosaico fluido” no qual as moléculas de lipídeos e de proteínas movem-se lateralmente no plano da bicamada, pois as interações entre

lipídeos e proteínas não são covalentes. Essa mobilidade lateral dos fosfolipídios é conferida pela característica de fluidez da membrana na temperatura corpórea. A fluidez da membrana plasmática regula funções específicas como a capacitação espermática, a reação acrossomal e a ligação entre espermatozoide e ovócito (Hall, Hadley e Doman, 1991). A redução da fluidez foi observada em espermatozoides de homens inférteis (Salvolini et al., 2013).

2.1.1.1 Composição lipídica da membrana plasmática

A composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide é importante para a função, pois cada espécie de lipídio atribui à membrana uma característica única (Amann e Graham, 2010). Os lipídeos da membrana plasmática do espermatozoide de diferentes espécies incluem fosfolipídeos, esteróis e glicolipídeos. A composição da membrana do espermatozoide varia em relação a espécie, sendo de equino formada por 57% de fosfolipídeos, 37% de colesterol e 6% de glicolipídeos. Em suínos 67% fosfolipídeos, 25% colesterol e 8% glicolipídeos. Os glicolipídeos são encontrados no folheto externo da membrana plasmática e são os menores componentes que constituem a membrana (Cooper, 1996).

Os lipídeos apresentam papel importante na célula: estoque de energia, modificações estruturais e funcionais da membrana e efeito na interação célula-célula (Stubbs e Smith, 1984). A classificação se baseia nos componentes estruturais que o compõe: glicerídeos, esteróis, fosfolipídeos, ácidos graxos, glicolipídeos, lipoproteínas. Os fosfolipídeos são moléculas anfipáticas formadas por duas cadeias de ácidos graxos poli-insaturados hidrofóbicos ligados a um grupo fosfato que constitui a cabeça hidrofílica (Cooper, 1996).

As caudas da estrutura do fosfolipídeo são ácidos graxos e podem ser diferentes em comprimento, em ligações duplas (insaturadas) e simples (saturadas). A saturação dos ácidos graxos influencia na capacidade de agregação dos fosfolipídeos afetando a fluidez da membrana plasmática (Siqueira, 2004). As cadeias de ácidos graxos não são solúveis em água o que leva a formação da bicamada de fosfolipídeos em solução aquosa (Figura 2).

Os ácidos graxos são ácidos monocarboxílicos de longas cadeias de hidrocarbonetos acíclicas, não polares. Podem ser saturados, monoinsaturados (uma ligação dupla) ou poli-insaturados (duas ou mais ligações duplas). Os mais abundantes contêm 16 e 18 carbonos.

As três famílias de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) são classificados de acordo com a distância da primeira ligação em relação ao terminal metil n-3, n-6 e n-9. PUFAs de série n-3 são essenciais para atividade reprodutiva e representam cerca de 30-50% do total de ácidos graxos presentes na membrana dos espermatozoides (Stubbs e Smith, 1984), contribuindo para a fluidez e flexibilidade da membrana.

O ácido graxo docosahexaenoico (22 carbonos e seis ligações duplas) é único de espermatozoides e forma 50% do total de ácidos graxos e 30% de ácido palmítico (ácido graxo saturado de 16 carbonos; Amann e Graham, 2010).

A composição de ácidos graxos da membrana plasmática de espermatozoide está relacionada a resistência da célula ao frio. A alta quantidade de DHA (ácido docosahexaenoico) na composição da membrana confere maior resistência a criopreservação espermática em raposas, touros (Miller et al., 2005), homem (Gulaya et al., 2001) e elefante africano (Swain e Miller, 2000).

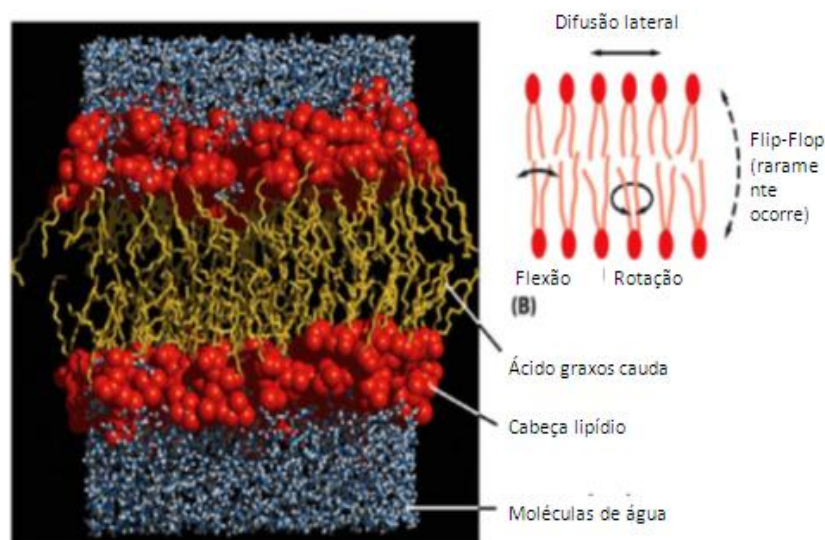


Figura 2: Estrutura da bicamada de fosfolípidios da membrana plasmática.

Fonte: Molecular Biology of the Cell. (Garland Science, 2008).

O fosfolípídeo é o principal constituinte que confere a característica de fluidez da membrana, a qual depende da composição e da temperatura. A mudança de estado fluido para gel em membranas com maior proporção de lipídeos de cadeia insaturada ocorre em temperaturas menores. O esterol, por ser uma estrutura plana rígida entre as cadeias laterais dos ácidos graxos, também é um constituinte importante na temperatura de transição (Albert et al., 1997).

Os fosfolípídeos da membrana dos espermatozoides podem ser encontrados na face externa da camada (esfingomielina e fosfatidicolina) e outros na face interna (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol; Lehninger, 2000).

Análises da composição lipídica de espermatozoides de rato revelaram que o fosfolípídeo em maior quantidade é fosfatidilcolina (63%), seguido de outras categorias como fosfatidiletanolamina (15%) e lisofosfatidilcolina (10%); difosfatidilglicerol, fosfatidilinositol e fosfatidilserina estavam presentes em menor quantidade (< 10%) (Parks e Lynch, 1992).

A parte lipídica da membrana plasmática do espermatozoide equino possui: 23,2% de fosfatidicolina, 8% de fosfatidiletanolamina, 7,5% de fosfatidilserina, 6,4% de esfingomielina, 6,2% de seminolípídeo, 2,5% de fosfatidilglicerol, 1,5% de fosfatidilinositol (Gadella et al., 2001). De acordo com García et al., (2011) o ácido graxo mais abundante em equinos é o ácido docosopentanoico (49,9%) seguido pelo ácido palmítico (17%). O mesmo trabalho verificou que a porcentagem do ácido docosopentanoico variou significativamente entre os garanhões avaliados.

O colesterol é o principal esterol da membrana plasmática dos espermatozoides; apresenta estrutura de espiral rígido inserido na bicamada de fosfolípídios e regula a estabilidade e permeabilidade da membrana plasmática (Cross, 1998). Quanto maior a quantidade de colesterol presente menos fluida ou flexível é a membrana (Amann e Graham, 2010) e a fluidez é importante para a resistência aos processos de criopreservação (Giraud et al., 2000).

O colesterol estabiliza a membrana diminuindo a temperatura na qual esta estrutura altera de fase fluido-cristalina para gel, criando um estado fluido intermediário e elimina completamente a fase de transição quando em alta

concentração (Kirk et al., 2001). Além disso, quando adicionado ao espermatozoide, o colesterol aumenta a tolerância às alterações osmóticas (Glazar et al., 2009).

Parks e Lynch (1992) verificaram que a relação colesterol:fosfolípídeo é 0,36 em espermatozoides de garanhão. Esta relação é mais alta em espermatozoides de bovinos (0,45) e baixa em galo (0,30) e javali (0,26). Quanto maior a proporção colesterol:fosfolípídeos mais resistente é a membrana plasmática às mudanças de temperatura (Amann e Pickett, 1987). Em algumas espécies, a concentração de colesterol na membrana plasmática se altera durante a maturação no epidídimo e a relação colesterol:fosfolípídeos aumenta durante o trânsito epididimário em pequenos ruminantes (Rana et al., 1991) e diminui em ratos e garanhões (Hall et al., 1991).

Trocas de colesterol por fosfolípídeos entre a membrana plasmática e o meio extracelular diminui o conteúdo de colesterol aumentando a fluidez de membrana desencadeando a reação acrossomal, por diminuir a adesão dos fosfolípídeos e permitir maior influxo de cálcio para a célula espermática (Albert, 1997; Cross, 1998). A criopreservação pode induzir essa reação causando danos irreversíveis a célula espermática, caracterizada pela perda de lipídeos para o meio extracelular, reduzindo o metabolismo celular e perda da motilidade (Graham, 2010).

Em baixas temperaturas o colesterol interfere nas interações entre as cadeias de ácidos graxos, protegendo a membrana dos efeitos da refrigeração, mantendo sua fluidez. Hartwing et al (2014) verificaram melhora da cinética espermática e integridade de membrana dos espermatozoides refrigerado em meio diluente contendo colesterol. Em altas temperaturas o colesterol torna a parte interna da membrana menos fluida, reduzindo a permeabilidade às pequenas moléculas (Cooper, 1996).

Em condições normais, uma adequada quantidade de colesterol e aleatória distribuição de proteínas integrais impõe uma configuração laminar nos fosfolípídeos e a bicamada se mantém. Em algumas condições, os lipídios mudam em matrizes cristalinas e as proteínas se agregam. Isto induz a instabilidade da membrana que pode sofrer um dano irreversível (Amann e Graham, 2010).

Uma categoria de fosfolipídeos, localizada ao redor das proteínas integrais, formada por cadeias de ácidos graxos poli-insaturados assume uma forma cônica, ou hexagonal II (ou micela), onde as extremidades hidrofóbicas são externas e as hidrofílicas internas, ao contrário da forma laminar (Figura 3). Esta forma de micela promove um defeito induzindo a fusão da membrana e alterando a permeabilidade permitindo a passagem de íons e pequenas moléculas para o meio intracelular. Entretanto, uma agregação similar à forma hexagonal II é necessária para a reação acrossomal e fertilização (Amann e Picket, 1987).

As proteínas integrais evitam a forma hexagonal II ou micela, porém quando ocorre o resfriamento e a transição da fase fluida para a fase gel, as proteínas movem-se para regiões mais fluidas aglomerando-se nestes locais da membrana, permitindo este tipo de formação. Esta formação pode ser transitória ou irreversível mesmo após o retorno da membrana a fase fluida (Parks e Graham, 1992).

2.2 Alterações estruturais da membrana durante processo de criopreservação

2.2.1. Choque térmico

A preservação do sêmen em baixas temperaturas, refrigeração ou congelação, causa danos às células espermáticas que diminuem a fertilidade. A habilidade de a célula espermática suportar o choque térmico é adquirida durante a maturação epididimária, principalmente pelas mudanças nos lipídios da membrana plasmática. Alterações na frequência das ejaculações e no tempo de armazenamento epididimário podem explicar as diferenças de congelabilidade entre ejaculados de um mesmo indivíduo (Watson, 1995).

O termo choque térmico é utilizado para classificar um conjunto de alterações, reversíveis ou não, sofrida pela célula espermática após mudança da temperatura externa. É caracterizado pelo aparecimento de movimento circular fechado, perda de motilidade, diminuição na produção de energia, aumento da permeabilidade da membrana e perda de moléculas e íons intracelulares (Parks e Graham, 1992). Além disso, espermatozoides de várias espécies apresentam flexão irreversível da peça intermediária,

enrolamento da cauda, cauda dobrada para trás e espermatozoide com movimento retrógrado (Waston e Morris, 1987; Waston, 1990).

O tipo de fosfolípídeos e a quantidade de proteínas presentes na membrana plasmática influenciam na sensibilidade ao choque térmico, sendo que espécies que apresentam maior proporção de fosfatidilcolina:fosfatidiletanolamina são mais resistentes e espécies que possuem maior quantidade de proteínas são menos resistentes (Parks e Lynch, 1992).

As primeiras alterações acontecem quando o sêmen é submetido à faixa de temperatura entre 20 e 1°C. Os lipídeos da membrana plasmática do espermatozoide, quando submetido a temperaturas na faixa entre 19 e 8°C, passam pela fase de transição do estado líquido-cristalino para o estado de gel (Parks e Graham, 1992; Amann e Graham, 2010). Esta fase de transição é uma consequência da alteração na forma da molécula do fosfolípídeo induzida pela temperatura baixa (Amann e Pickett, 1987). Os fosfolípídeos perdem a capacidade de movimentação aleatória, devido à rigidez das cadeias de ácidos graxos (Amann e Graham, 2010), e as proteínas integrais se agregam. A agregação proteica resulta em aumento da permeabilidade da membrana plasmática e diminuição do metabolismo celular (Amann e Pickett, 1987).

A temperatura da fase de transição de um lipídeo é determinada pela natureza do grupo da cabeça do fosfolípídeo, pelo comprimento da cadeia de ácido graxo (cadeias curtas apresentam temperatura baixa de transição) e pelo grau de instauração das cadeias (cadeias com mais ligações insaturadas têm baixa temperatura de transição). Quando a temperatura da membrana diminui abaixo da temperatura de transição de uma espécie de lipídeo, este lipídeo será submetido à fase de transição e agregado, formando a fase gel em um determinado ponto da membrana. A interação destas regiões da membrana (em fase gel e a porção fluida) criam pontos de permeabilidade de íons levando a instabilidade e ruptura da membrana (Amann e Graham, 2010).

Nem todos os lipídeos da membrana do espermatozoide se organizam em bicamada. Quando a membrana está estável, esta espécie de lipídeos é encontrada em associação com proteínas integrais. A interação destes

lipídios com as proteínas é necessária para determinar a função destas, como enzima, receptor ou canal de íons (Quinn, 1989).

A queda de temperatura leva a produção ineficiente de ATP pela célula espermática, provocando mudanças na bomba de sódio e potássio da membrana plasmática com consequente despolarização da membrana e abertura dos canais de cálcio, processo semelhante à capacitação espermática. Este íon em grande quantidade no interior da célula, ativa as fosfolipases que levam a hidrólise dos fosfolípidos, aumentando a permeabilidade da membrana (Amann e Pickett, 1987). Espermatozoides de ratos e touros, com danos na membrana plasmática, apresentaram diminuição da glicólise anaeróbica e da respiração, causadas pela perda de ATP, enzimas glicolíticas e citocromo C (Waston e Morris, 1987).

A membrana acrossomal se torna mais permeável ao cálcio a 5°C do que a membrana mitocondrial. Altas concentrações de cálcio levam à prematura vesiculação da membrana acrossomal (Watson e Morris, 1987). A diferença da composição bioquímica destes dois compartimentos de membrana explica a rápida queda de fertilidade mesmo sem haver queda da motilidade em sêmen refrigerado (Amann e Graham, 2010).

A redução da temperatura também afeta a atividade das proteínas da membrana plasmática, reduzindo a atividade enzimática e o transporte de moléculas. A baixa temperatura altera o pH da célula induzindo uma mudança do pK da proteína, da carga elétrica e da sua função. Também altera a interação lipídio-proteína reduzindo a movimentação lateral na membrana e a desnaturação irreversível da proteína (Amann e Graham, 2010).

A célula espermática pode ser congelada de três maneiras: congelamento lento, rápido e ultra rápido. Quando a temperatura atinge a faixa de 0°C, cristais de gelo começam a se formar no meio extracelular, o que leva ao aumento da concentração de sal no fluido extracelular. A água no interior da célula espermática não congela e sai para o meio extracelular desidratando o espermatozoide. Se a água não sair do espermatozoide rapidamente, ocorre a formação de cristais de gelo intracelular. Os cristais de gelo intracelular causam graves danos à célula espermática. A curva de refrigeração interfere diretamente na integridade da célula: se for muito lenta a alta concentração de sal intracelular causa danos osmóticos ao

espermatozoide; se for muito rápida ocorrerá formação de cristais de gelo dentro da célula causando danos físicos (Amann e Pickett, 1987).

O resfriamento lento (-25 a $-40^{\circ}\text{C}/\text{min}$) leva a desidratação do espermatozoide devido à elevada concentração de solutos no meio extracelular não havendo formação de cristais de gelo intracelular. Porém, o efeito solução pode prejudicar a célula espermática (Waston, 1995). Este efeito é extremamente deletério para a célula devido a grande desidratação e a exposição a um meio extremamente saturado. É considerado um dos pontos críticos no processo de criopreservação (Waston, 1981).

O resfriamento ultrarrápido (curva $> -60^{\circ}/\text{min}$) não permite que toda a água intracelular saia antes do congelamento da célula, resultando na formação de microcristais de gelo dentro do espermatozoide. Estes não são capazes de danificar a célula espermática, mas a lesão pode ocorrer durante o aquecimento, pela reorganização dos microcristais em cristais maiores (Graham, 1996).

Thomas et al. (2006) observaram que a criopreservação aumenta as alterações de lipídeos da membrana espermática em equinos. A criopreservação de espermatozoides de homens reduziu a quantidade dos ácidos graxos docosapentaenoico e o docosahexaenoico. Esta redução foi também observada em espermatozoides de homens inférteis, o que indica a perda da função dos espermatozoides que sofreram esta alteração dos fosfolipídios (Gulaya et al., 2001). Os fosfolipídeos que mais se perdem durante a criopreservação são a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (Chakrabarty et al., 2007). A fosfatidilserina, fosfolipídio localizado no folheto interno da membrana plasmática, sofre uma translocação para o folheto externo quando ocorre dano grave à membrana, principalmente causado pelo choque frio (Graham, 2010).

2.2.2. Estresse oxidativo

O estresse oxidativo está relacionado à queda da fertilidade de espermatozoides preservados a baixas temperaturas. É provocado pelo excesso de produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) que causam danos a membrana plasmática e ao DNA dos espermatozoides (Sikka et

al.,1995).

As espécies reativas de oxigênio são moléculas de radicais livres e derivados de oxigênio que causam dano oxidativo em membranas lipídicas, proteínas e carboidratos, danificando ácidos nucleicos e despolimerizando o ácido hialurônico (Agarwal e Parabakaran, 2005). Apresentam efeitos benéficos e deletérios para a função espermática de acordo com sua concentração. Em altas concentrações causam a peroxidação lipídica da membrana, alterando sua fluidez, diminuindo a capacidade fertilizante podendo causar a morte celular (Park et al., 2012).

Concentrações reduzidas de ROS são importantes para processos bioquímicos normais (defesa contra patógenos, crescimento celular), apresentando papel importante na maturação espermática de mamíferos (Lamirande e Gagnon, 1993). A maioria das espécies animais possui sistema de proteção capaz de neutralizar os efeitos deletérios ocasionados pelos ROS formadas durante o metabolismo do oxigênio e da oxidação de lipídios. Antioxidantes, como α -tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C), bloqueiam a ação das espécies reativas de oxigênio que levam a oxigenação dos ácidos graxos poli-insaturados que compõem a membrana plasmática dos espermatozoides (Agarwal et al, 2008). O efeito citotóxico das ROS pode ser completamente eliminado pela presença da catalase, porém o espermatozoide parece ser desprovido desta enzima (Godeas et al., 1997).

A membrana espermática por ser rica em ácidos graxos poli-insaturados, se torna altamente sensível às ROS, que quando oxidam as cadeias produzem novos metabólitos oxidantes, potencializando o dano celular, resultando em perda da motilidade espermática e indução da apoptose (Bansal e Bilaspuri, 2010).

No interior da membrana plasmática, na parte hidrofóbica, as ROS são produzidas e se ligam a moléculas de oxigênio formando o radical peroxil. Este radical oxida os ácidos graxos adjacentes formando o hidroperóxido. Por serem hidrofílicos, os hidroperóxidos migram para a superfície para interagir com a água, provocando a ruptura da membrana (Buettner, 1993).

Os tocoferóis removem os radicais peroxil antes que oxidem os ácidos graxos adjacentes e estão presentes na dupla camada lipídica das membranas celulares. A ação deste antioxidante é intensificada pela

glutathione-peroxidase que converte peróxidos orgânicos e peróxidos de hidrogênio em álcoois e água evitando a lesão na célula. A glutathione-peroxidase contém selênio em sua estrutura ativa e pode explicar a eficiência do selênio na prevenção de estresse oxidativo celular (Buettner, 1993).

A célula espermática, durante a maturação, apresenta proteínas capazes de remover as ROS: SOD1 (superoxide dismutase 1), GPX (glutathione peroxidase) e a Peroxiredoxin 5 (Park et al., 2012). A GPX e a SOD1 são enzimas antioxidantes adsorvidas pela membrana plasmática do espermatozoide (Tavilani et al., 2008). Em humano a SOD1 (33 kDa) é um antioxidante importante para evitar a peroxidação de lipídios e proteínas e danos ao DNA causados pelas ROS (Strange et al., 2003; Tavilani et al., 2008). A SOD1 remove O_2^- e forma H_2O_2 a qual é removida pela catalase ou pela GPX (Park et al., 2012).

2.3. Espectrometria de Massa

Método para identificar as diferentes moléculas que compõem uma substância. O espectrômico de massa bombeia moléculas com um feixe de íons ou elétrons de alta energia para extrair íons de uma amostra. Nos anos oitenta, o processo foi catalisado por dois métodos de ionização de amostras para análise por espectrometria de massa (MS): a ionização por electrospray e a desorção de matriz assistida por laser (MALDI; Murphy, Fielder e Hevko, 2001).

A análise consiste na geração de íons a partir de compostos orgânicos ou inorgânicos por meio de um método de ionização apropriado. Os íons são separados em um analisador de massas em relação sua massa-carga (m/z). Um detector conta os íons qualitativamente e ou quantitativamente. Apresentam um setor magnético (ímã) responsável pela separação das partículas iônicas. Os íons atravessam o campo magnético que curva suas trajetórias em linhas diferentes, dependendo da relação massa-carga, separando os íons em um padrão chamado espectro de massa. A massa e a carga dos íons são identificadas por sua posição no espectro (Croxatto, Prod'hom e Greub, 2012).

Para análise as amostras podem ser inseridas diretamente no

espectrômetro de massa ou o equipamento pode ser acoplado a uma técnica de separação, como a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida ou a eletroforese capilar (Schiller et al., 2007).

Permite a análise exata do peso molecular da amostra, além de conferir alta tolerância aos sais, tampões e detergentes que possam estar presente na amostra.

A técnica de MALDI é acoplada a detectores de espectrômicos que utilizam as diferenças entre tempo-de-vôo (TOF) das moléculas considerando diferenças de tamanho. Os íons são submetidos a uma mesma força cinética e podem ser identificados pelo tempo de “~~—~~imagem” entre a fonte de íons e o detector (Fernandez-Lima et al., 2005)

A técnica de MALDI-TOF foi originalmente desenvolvida para análise de proteínas, entretanto tem se mostrado eficiente, prática e rápida para qualificar lipídios do espermatozoide e do plasma seminal de suínos, humanos, bovinos e roedores (Leissig et al., 2004; Schiller et al., 2000; Schiller et al., 2007; Fuchs et al., 2007; Teuber et al., 2011; Nimptsch et al., 2013; Pyttel et al., 2014). Em recente experimento a técnica de MALDI-TOF foi utilizada em laboratório de microbiologia para identificar bactérias e fungos (Croxatto, Prod'hom e Greub, 2012).

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; PARABAKARAN, S. A. Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. **Indian. J. Exp. Biol.**, v.43, p. 963 – 974, 2005.

AGARWAL, A.; MAKKER, K. SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **Am. J. Reprod. Immunol.**, v. 59, p. 2 – 11, 2008.

ALBERT, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. **Biologia molecular da célula**. 3 ed. Porto Alegre: Artes Médicas, p. 506, 1997.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. In: **Equine reproduction**, p.1053– 1084, 2010.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principals of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **J Equine Vet Sci** 7, p.147-173, 1987.

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

ARIENTI, G.; CARLINI, E.; SACCARDI, C.; PALMERINI, C. A.. Role of human prostasomes in the activation of spermatozoa. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 8, p. 77 – 84, 2004.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International.**, v.2011, p.1-7, 2010.

BEDFORD, J. M. Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. **Biol. Reprod.**, v. 28, p. 108 – 120, 1983.

BROUWERS, J. F.; BOERKE, A.; SILVA, P. F.; GARCIA-GIL, N.; GESTEL, R. A.; HELMS, J. B.; LEST, C. H. V.; GADELLA, B. M. Mass spectrometric

detection of cholesterol oxidation in bovine sperm. **Biol. Reprod.**, v. 85, p. 128-136, 2011.

BUETTNER, G. R. The packing order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 300, p. 535 – 543, 1993.

CHAKRABARTY, J.; BANERJEE, D.; PAL, D.; DE, J.; GHOSH, A.; MAJUMDER, G. C. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. **Cryobiology**, v. 54, p. 27 – 35, 2007.

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

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol. Rev.** 36, p. 380-407, 2012.

FERNANDEZ-LIMA, F. A.; PORCIANO, C. R.; PEDRERO, E.; DA SILVEIRA, E. F. Acoplamento das espectrometrias de mobilidade iônica e de massa MALDI-TOF. *Revista Brasileira de Aplicações de Vácuo*. v. 24, n.2, p. 74-80, 2005.

GARDELLA, B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 229-236, 2008.

GARDELLA, 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. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, n.5, p.24, 2001.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóide e plasma seminal. In: **Reprodução Animal**. 7. Ed. Barueri: Manole, Cap. 7, p. 97-110, 2004.

GIRAUD, M. N.; MOTTA, C.; BOUCHER, D.; GRIZAR, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Hum Reprod**, v.15, p. 2160 – 2164, 2000.

GLAZAR, A. I.; MULLEN, S. F.; LIU, J.; BENSON, J. D.; CRITSER, J. K.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, v. 59, p. 201 – 206, 2009.

GODEAS, C.; TRAMER, F.; MICALI, F.; SORANZO, M.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Distribution and possible novel role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1502 – 1508, 1997.

GRAHAM, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Reproduction and Technology**, v.12, p. 131 – 145, 1996.

GRAHAM, J. K. Principles of cooled semen. In: **Equine reproduction**, p. 1308, 2010.

GULAYA, N. M.; MARGITICH, V. M.; GOVSEEVA, N. M.; KLIMASHEVSKY, V. M.; GORPYNCHENKO, I. I.; BOYKO, M. I. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. **Arch. Androl.**, v.4, p. 169 – 175, 2001.

HALL, J. C.; HADLEY, J.; DOMAN, T. Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein and membrane physical state during epididymal maturation. **J Androl**, v.12, p. 76 – 87, 1991.

HARRISON, R. A.; ASHWORTH, P. J. C.; MILLER, N. G. A. Bicarbonate/ CO₂ an effector of capacitation induces a rapid and reversible change in the lipid architecture of boar sperm plasma membranes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p.378 – 391, 1996.

HARTWIG, F.P.; LISBOA, F.P.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R. FREITAS-DELL AQUA, C.P.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; DELL AQUA, J.A. **Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions.** *Theriogenology*, v.15; p.340-346, 2014.

KIRK, E. S.; GRAHAM, J. K.; SQUIRES, E. L. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 317–318, 2001.

KLINEFELTER, G. R.; LASKEY, J. W.; FERRELL, J.; SUAREZ, J. D.; ROBERTS, N. L. Discriminant analysis indicates a single sperm protein (SP22) is predicative of fertility following exposure to epididymal toxicants. **J. Androl.**, v. 18, p. 139 – 150, 1997.

KLINEFELTER, G. R.; WELCH, J. E.; PERREAULT, S. D.; MOORE, H. D.; ZUCKER, R. M.; SUAREZ, J. D.; ROBERTS, N. L.; BOBSEINE, K.; JEFFAY, S. Localization of the sperm protein SP 22 and inhibition of fertility *in vivo* and *in vitro*. **J. Androl.**, v. 23, p. 48-63, 2002.

LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. A. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human spermatozoa. **Int. J. Androl.**, v. 16, p. 21 – 25, 1993.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Savier, p. 838, 2000.

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

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; ME NARDE, 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, 2002.

METZ, K. W.; BERGER, T.; CLEGG, E. D.. Adsorption of seminal plasma proteins by boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 34, p. 691 – 700, 1990.

MEYERS, S.A. Sperm physiology. In: **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Second Edition, p. 47-55, 2009.

MILLER, R. R. Jr; CORNETT, C. L.; WATERHOUSE, K. E.; FARSTAD, W. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver and blue foxes, and their relationship to cell cryopreservation. **Cryobiology**, v. 51, p. 66 – 75, 2005.

MORRIS, G. J. Rapidly cooled human sperm: no evidence of intracellular ice formation. **Hum. Reprod.**, v. 21, p. 2075 – 2083, 2006.

PARK, K.; JEON, S.; SONG, Y. J.; YI, L. S. H. Proteomic analysis of boar spermatozoa and quantity changes of superoxide dismutase 1, glutathione peroxidase, and peroxiredoxin 5 during epididymal maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 135, p. 53 – 61, 2012.

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 membranes. **Cryobiology**, v.29, p. 255 – 266, 1992.

QUINN, P. J. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. **J Bioenerg Biomembr**, v. 21, p. 3 – 19, 1989.

RAJEEV, S. K.; REDDY, K. V. Sperm membrane protein profiles of fertile and infertile men: identification and characterization of fertility associated sperm antigen. **Hum. Reprod.**, v. 19, p. 234 – 242, 2004.

RANA, A. P.; MAJUMDER, G. C.; MISRA, S.; GHOSH, A. Lipid changes of goat sperm plasma membrane during epididymal maturation. **Biochim Biophys**, v.1061, p.185 – 196, 1991.

SALVOLINI, E.; BULDREGHINI, E.; LUCARINI, G.; VIGNINI, A.; LENZI, A.; PRIMIO, R. P.; BALERCIA, G. Involvement of sperm plasma membrane and cytoskeletal proteins in human male infertility. **Fertility and Sterility**, v. 99, p. 697 – 704, 2013.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. reactive oxygen species and sperm cells. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 2, p. 12, 2004.

SIKKA, S. C.; RAJASEKARAN, M.; HELLSTROM, W. J. G. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **J. Androl**, v. 16, p. 464 – 468, 1995.

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

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: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory*, 1999.

STRANGE, R. W.; ANTONYUK, S.; HOUGH, M. A.; DOUCETTE, P. A.; RODRIGUEZ, J. A.; HART, P. J.; HAYWARD, L. J.; VALENTINE, J. S.; HASNAIN, S. S. The structure of holo and metal deficient wild type human Cu, Zn superoxide dismutase and its relevance to familial amyotrophic lateral sclerosis. **J. Mol. Biol.**, v. 328, p. 877 – 891, 2003.

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.

SWAIN, J. E.; MILLER, R. R. Jr. A post-cryogenic comparison of membrane fatty acids of elephant spermatozoa. **Zoo. Biol.**, v. 19, p. 461 – 473, 2000.

TAVILANI, D. H.; GOODARZI, M. T.; DOOSTI, M.; VAISI-RAYGANI, A.; HASSANZADEH, T.; SALIMI, S.; JOSHAGHANI, H. R. relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. **Reproductive BioMedicine Online.**, v. 16, p. 649 – 656, 2008.

THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology**, v.65, p.1531-50, 2006.

TROEDSSON, M. H. T.; MILLER, L. M. J.; ROBERT, K. P. Cryopreservation of equine spermatozoa alters the expression of sperm protein 22kDa (SP22). In: Proceedings of a Workshop on Transporting Gametes and Embryos, Brewster. **Havemeyer Foundation Monograph Series** n° 12, p. 83, 2003.

VISCONTI, P. E.; KOPF, G. S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction.**, v. 59, p. 1 – 6, 1998.

WASTON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60 – 61, p. 481 – 492, 2000.

WATSON, P. F. recents developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Repod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 871 – 891, 1995.

WATSON, P. F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: **The effect of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, p. 189 – 218, 1981.

3. HIPÓTESE

- 1) Espermatozoides de cavalos e jumentos apresentam diferentes perfis lipídicos da membrana plasmática.
- 2) Qual a influência da criopreservação na composição lipídica da membrana plasmática do espermatozoide?

4. OBJETIVOS

- 1) Comparar perfil lipídico dos espermatozoides de jumentos e cavalos.
- 2) Comparar perfil lipídico da membrana dos espermatozoides de jumentos antes e após os processos de criopreservação.

CAPÍTULO 2

Trabalho a ser enviado para a revista *Theriogenology*

Comparação do perfil lipídico do espermatozoide de jumentos (*Equus asinus*) e cavalos (*Equus caballus*)

Maria Manoela de Castro Chaves¹, Carlos Ramires Neto¹, Katia Roberta Belaz², Davila Zampieri², Alessandra Tata², Marcos Nogueira Eberlin², Mateus José Sudano³, Marco Antonio Alvarenga¹, Camila de Paula Freitas Dell'Aqua¹, Frederico Ozanam Papa¹, José Antonio Dell'Aqua Júnior¹

¹ Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu -
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

² Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas, Instituto de Química da
Universidade Estadual de Campinas

³ Curso de Veterinária da Universidade Federal do Pampa

RESUMO

Os equinos e asininos pertencem à família Equidae e gênero *Equus*, por este motivo são considerados similares e tratados de forma equivalente em relação à fisiologia reprodutiva. O conhecimento de diferenças morfofuncionais entre os espermatozoides destas espécies pode contribuir para melhorar as biotécnicas relacionadas ao processamento do sêmen de jumentos. Além da importância da composição lipídica das membranas espermática sobre a qualidade do sêmen e a sua resistência à criopreservação, é conhecida a existência de diferenças na composição lipídica das membranas espermáticas entre garanhões, entre duas raças de garanhões e entre espécies filogeneticamente próximas, como os gatos e tigres. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo comparar o perfil lipídico das membranas dos espermatozoides de jumentos e cavalos. Foram utilizados 19 jumentos da raça Pêga e 25 garanhões da raça Quarto de Milha. Uma alíquota de 50×10^6 de espermatozoides foi removida em duplicata, disposta em criotubo e congelada em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior avaliação do perfil lipídico. O restante do ejaculado foi diluído com diluente comercial à base de leite desnatado (Botu-sêmen[®], Botupharma) para a concentração de 50×10^6 espermatozoides por mL para realização das análises das características espermáticas. A análise do perfil lipídico foi realizada por espectrometria de massa MALDI-MS no sêmen fresco (sem a adição de diluente). Foram identificados 101 íons lipídicos na membrana

espermática de cavalos e 105 íons em jumentos. A espécie asinina apresentou maior abundância relativa de 18 íons e a espécie equina de 10 íons lipídicos. Assim pode-se concluir que a composição lipídica da membrana do espermatozoide de jumentos é diferente de cavalos. Apresentando maior variação de fosfolipídios e maior abundância relativa de 18 fosfolipídeos.

Palavras-chave: fosfolipídeo, MALDI-MS, asinino, garanhão, membrana plasmática.

INTRODUÇÃO

Os equinos e asininos pertencem à família Equidae e género *Equus*, por este motivo são considerados similares e tratados de forma equivalente em relação à fisiologia reprodutiva. Nos últimos anos vários estudos foram direcionados para aprimoramento das biotecnologias relacionadas à espécie *Equus asinus* dos jumentos. Porém, vários trabalhos já comprovaram particularidades da espécie asinina em relação às características seminais [1,2], comportamento sexual [3, 4, 5, 6] e criopreservação de sêmen [7, 8, 9].

Assim sendo, o conhecimento de diferenças morfofuncionais entre os espermatozoides destas espécies pode contribuir para melhorar as biotécnicas relacionadas ao processamento do sêmen de jumentos. Uma característica da célula espermática que esta diretamente relacionada ao sucesso do emprego das biotécnicas é a composição da membrana plasmática.

A membrana da célula espermática é diferente da maioria das demais membranas celulares. Suas características únicas de ligação, fusão, metabolismo e proteção, conferem funções só encontradas nos espermatozoides. A estrutura lipídica destas células vem sendo estudada em diversas espécies (bovinos [10], equinos [11], raposas [12], felinos [13], koalas [14] e humanos [15]) com o objetivo de mapear lipídeos, a fim de promover avanços nas terapias para melhora da qualidade seminal, como na preservação espermática.

Os lipídeos desempenham importante papel na fluidez e flexibilidade da membrana, bem como na motilidade e viabilidade espermática [14]. Os ácidos graxos insaturados, como o ácido docosahexaenóico ou o ácido

docosapentaenóico, são responsáveis pela fluidez da membrana espermática e capacidade fertilizante [16,17].

Além da importância da composição lipídica das membranas espermática sobre a qualidade do sêmen e a sua resistência à criopreservação, é conhecida a existência de diferenças na composição lipídica das membranas espermáticas entre garanhões [18], entre duas raças de garanhões [19] e entre espécies filogeneticamente próximas, como os gatos e tigres [13].

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo comparar o perfil lipídico das membranas dos espermatozoides de jumentos e cavalos.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita sêmen e avaliações iniciais

Foram utilizados 19 jumentos da raça Pêga e 25 garanhões da raça Quarto de Milha, com idade entre 7 e 15 anos alojados em haras no estados de São Paulo. Todos os animais apresentavam boa qualidade do sêmen fresco (Motilidade total superior a 60% e motilidade progressiva > 30%) e histórico de fertilidade conhecido.

Foi colhido um ejaculado de cada animal através de vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), após a colheita o sêmen foi filtrado em filtro de nylon (Minitub[®], Alemanha) para remoção da fração gel. A concentração espermática foi aferida por câmara de Neubauer e uma alíquota de 50×10^6 de espermatozoides foi removida em duplicata, disposta em criotubo e congelada em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior avaliação do perfil lipídico. O restante do ejaculado foi diluído com diluente comercial à base de leite desnatado (Botu-sêmen[®], Botupharma) para a concentração de 50×10^6 espermatozoides por mL para realização das análises das características espermáticas.

Cinética espermática

As análises de cinética espermática foram feitas pelo método computadorizado CASA (HAMILTON THORNE RESEARCH – IVOS 12)

utilizando o mesmo setup para ambas as espécies. Os parâmetros avaliados foram a motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), velocidade linear progressiva (VSL; $\mu\text{m/s}$) velocidade de trajeto VAP ($\mu\text{m/s}$), e espermatozoides rápidos (RAP%). A configuração do equipamento de CASA está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Configuração do equipamento de CASA utilizado nas análises.

CARACTERÍSTICAS	AJUSTE
Número de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células imóveis	30 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	80 %
Referência para velocidade média (VAP)	<70 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VAP)	<30 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VSL)	<20 $\mu\text{m/s}$
Tamanho da cabeça estática	0,62 – 2,98 pixels
Intensidade da cabeça estática	0,24 – 1,19
Elongação da cabeça estática	100 - 0%
Lentos contados como móveis	Não
Magnificação	1,95

Integridade de membrana plasmática

A análise da integridade de membrana plasmática foi realizada pela técnica de microscopia de epifluorescência (Leica Microsystem – DMLB, Ernst-Leitz-Strabe, Wezlar Germany), utilizando a associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propideo

(IP) segundo técnica descrita por Harrison e Vickers, [20].

Perfil Lipídico da membrana plasmática

A análise do perfil lipídico foi realizada por espectrometria de massa MALDI-MS no sêmen fresco (sem a adição de diluente). As análises foram realizadas no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, na Universidade Estadual de Campinas.

A extração dos lipídios foi realizada pelo protocolo estabelecido por Bligh e Dyer [21]. A alíquota contendo os espermatozoides foi descongelada em temperatura ambiente e diluída com 1 mL de solução de PBS sem cálcio e magnésio. A mesma foi homogeneizada durante 3 minutos e centrifugada à 12000xg por 1 minuto. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e novamente as células foram lavadas. O sobrenadante foi descartado e 0,5 mL de uma solução de clorofórmio/metanol ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 1:2) foi adicionada e homogeneizada durante 5 minutos. Uma nova centrifugação à 5000xg por 3 minutos foi realizada e a fase inferior foi removida e criopreservada a -196°C até a análise por espectrometria de massa.

O volume de 1 μL do extrato lipídico foi adicionado sobre a placa MALDI e após a cristalização adicionou-se 1 μL da solução de DHB (30 mg em 1 mL de metanol). Os espectros foram adquiridos em modo positivo utilizando MALDI-MS Autoflex III por tempo de voo, equipado com tecnologia laser smartbeamTM (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os dados de MS foram adquiridos na faixa de m/z entre 700 e 1000 em média 1.500 disparos consecutivos de laser com uma frequência de 200 Hz. FlexAnalysis Software 3.0 foi utilizado para visualizar e processar os espectros de massas.

As estruturas dos fosfolipídios foram atribuídas baseadas na busca da literatura e a base de dados (<http://lipidsearch.jp> ou www.lipidmaps.org).

Análise estatística

Para a análise estatística da comparação das características de cinética espermática e integridade de membrana plasmática foi utilizado teste t, considerando significativo $p \leq 0,05$. Para o perfil lipídico foram utilizados modelos uni e multivariados. Os valores foram substituídos pela metade do valor mínimo positivo nos dados obtidos a partir do pré-processamento.

Os valores de intensidade de cada pico nos espectros foram auto-dimensionado (média-centrada e dividido pelo desvio padrão de cada variável), a fim de dar a mesma importância para cada valor em m/z. As análises foram realizadas utilizando o MetaboAnalyst 2,0, a análise discriminante dos quadrados mínimos parciais (PLS-DA), mostrando a relação entre a variância nos dados e as diferenças entre as espécies (Equinos e Asininos). As espécies de lípidos foram diferencialmente expressos identificados utilizando ANOVA seguido pelo teste de Tukey. *Vulcano plot* foi usado para comparar os dois grupos, usando os seguintes critérios: valores de $p \leq 0,05$ e *fold-change* (FC) $\geq 1,5$. Agrupamento hierárquico da espécie lipídica diferencialmente expressos foi realizada usando distâncias euclidianas ligações Ward foram utilizados para mostrar relação entre as amostras e funcionalidades.

RESULTADOS

Os dados da cinética espermática que apresentaram diferença estatística entre as espécies de jumentos e cavalos para os parâmetros de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP) e espermatozoides rápidos (RAP) estão dispostos na Tabela 2.

Os resultados do presente estudo identificaram 101 íons lipídicos em cavalos e 105 em jumentos. Cinco íons de massa carga (m/z) 762, 822, 865, 867 e 879 foram encontrados apenas em espermatozoides de cavalos. Em jumentos foram 9 íons exclusivos (m/z 709.4, 731, 753, 756, 778, 796, 798, 811 e 880).

Os asininos apresentaram maior abundância relativa de 18 íons de massa/carga 706.1, 734.6, 741.6, 745.5, 753.6, 754.6, 755, 756.6, 762.8, 769.6, 772.5, 782.7, 798.5, 801, 804.5, 847, 857.5 e 873.7. Em equinos dez íons de m/z 705.7, 717.5, 723.7, 772, 835, 836, 837.8, 851, 876 e 881 apresentaram maior abundância relativa (Tabela 3).

Tabela 2: Valores médios e desvios padrão da cinética espermática e da integridade da membrana plasmática do sêmen de jumentos e cavalos a fresco.

Grupo	MT(%)	MP(%)	VAP($\mu\text{m/s}$)	VSL($\mu\text{m/s}$)	RAP(%)	IMP(%)
Cavalo	81,6 $\pm$ 10,6 ^a	51,5 $\pm$ 9,7 ^a	128,4 $\pm$ 15,7 ^a	106,1 $\pm$ 12,6 ^a	76,2 $\pm$ 11,9 ^a	61,7 $\pm$ 17,1 ^a
Jumento	73,4 $\pm$ 11,4 ^b	36,8 $\pm$ 6,9 ^b	117,5 $\pm$ 12,2 ^b	98,7 $\pm$ 15,2 ^a	65,4 $\pm$ 9,9 ^b	68,4 $\pm$ 14,8 ^a

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, $p < 0,05$.

MT = motilidade total, MP = motilidade progressiva, VAP = velocidade de trajeto, VSL = velocidade retilínea, RAP = espermatozoides rápidos e IMP = integridade de membrana plasmática.

Um exemplo representativo de espectros dos fosfolipídeos encontrados na membrana espermática de Cavalos e Jumentos, obtidos por MALDI-MS, estão representados na Figura 1.

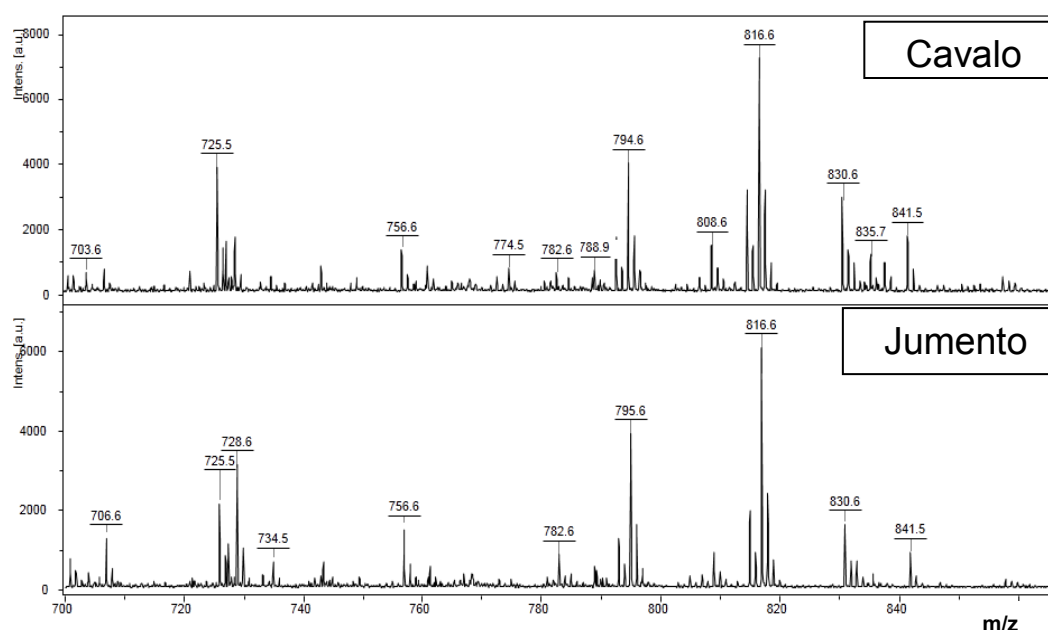


Figura 1: Exemplos representativos de espectros de massas dos perfis de fosfolipídeos obtidos dos cavalos e jumentos.

Tabela 3: Valores da quantidade total de íons, íons exclusivos de cada espécie, íons com maior abundância comuns, íons identificados e íons não identificados nos espermatozoides a fresco de cavalos e jumentos.

	Cavalo	Jumento
Total	101	105
Exclusivos	5	9
Maior abundância entre os comuns	10	18
Íons identificados	1	12
Íons não identificados	9	6

A Figura 2 representa a distribuição espacial das amostras de sêmen de jumentos e cavalos sobre a composição dos fosfolipídeos da membrana espermática.

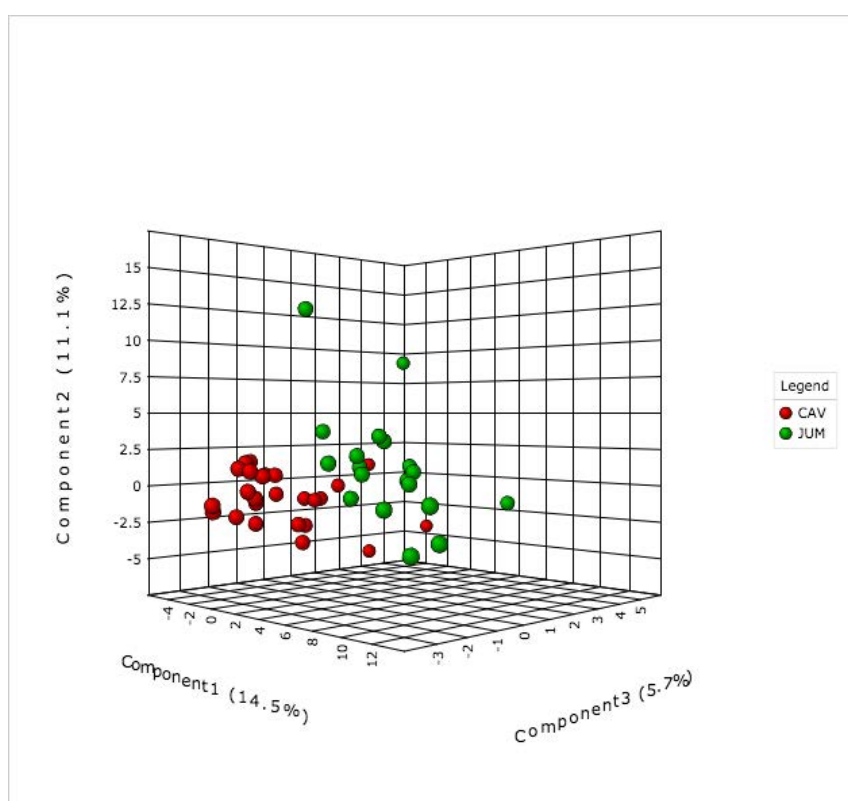


Figura 2: Representação gráfica da diferença do perfil de fosfolipídeos, analisado por PLS-DA, entre os grupos Cavalos e Jumentos.

Os íons lipídicos que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$ e *fold change* $> 1,5$) entre as duas espécies estudadas estão representados nas Figuras 3 e 4.

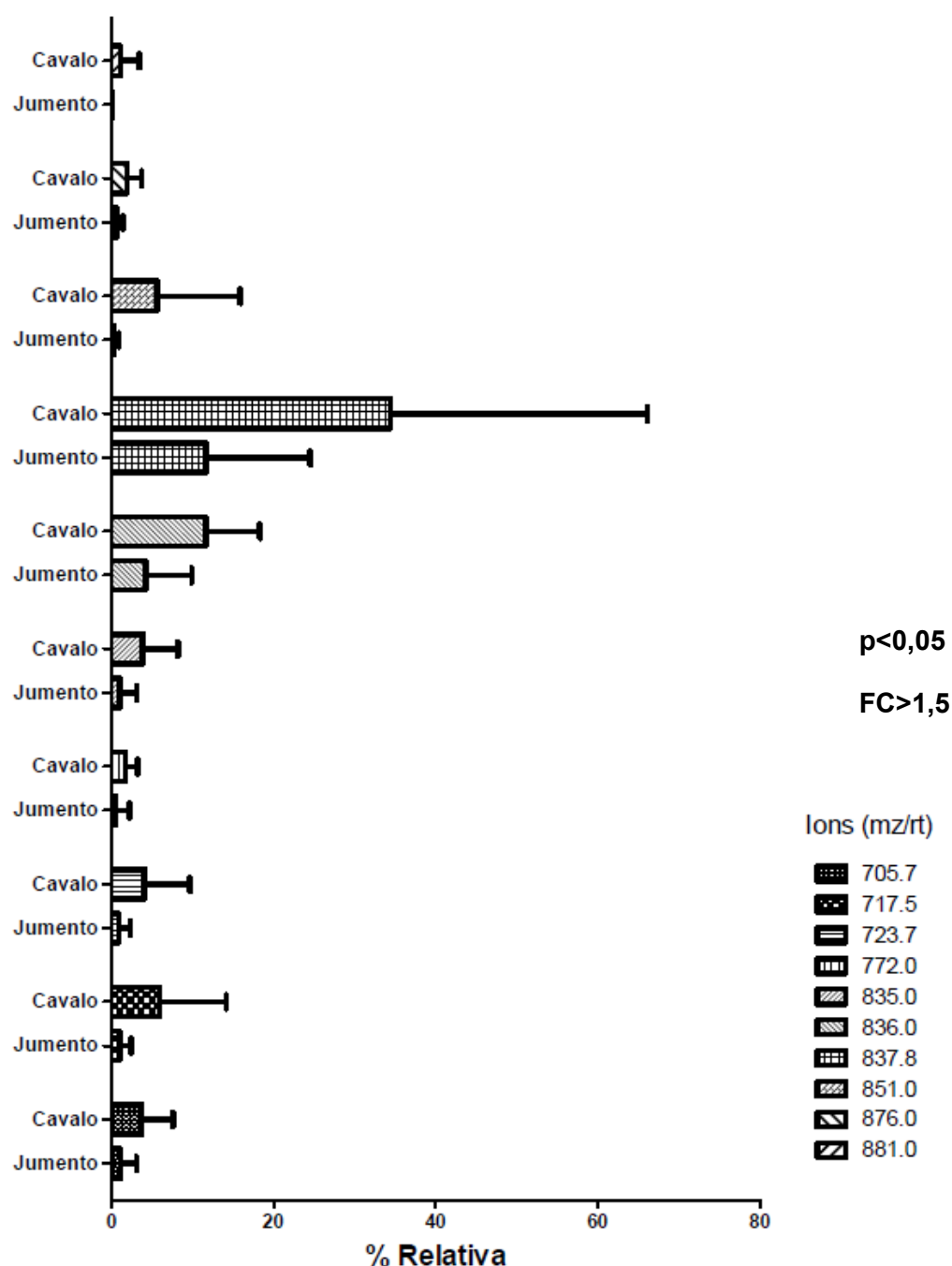


Figura 3: Representação gráfica dos íons lipídicos que apresentaram maior abundância relativa na membrana espermática de cavalos em relação aos de jumentos.

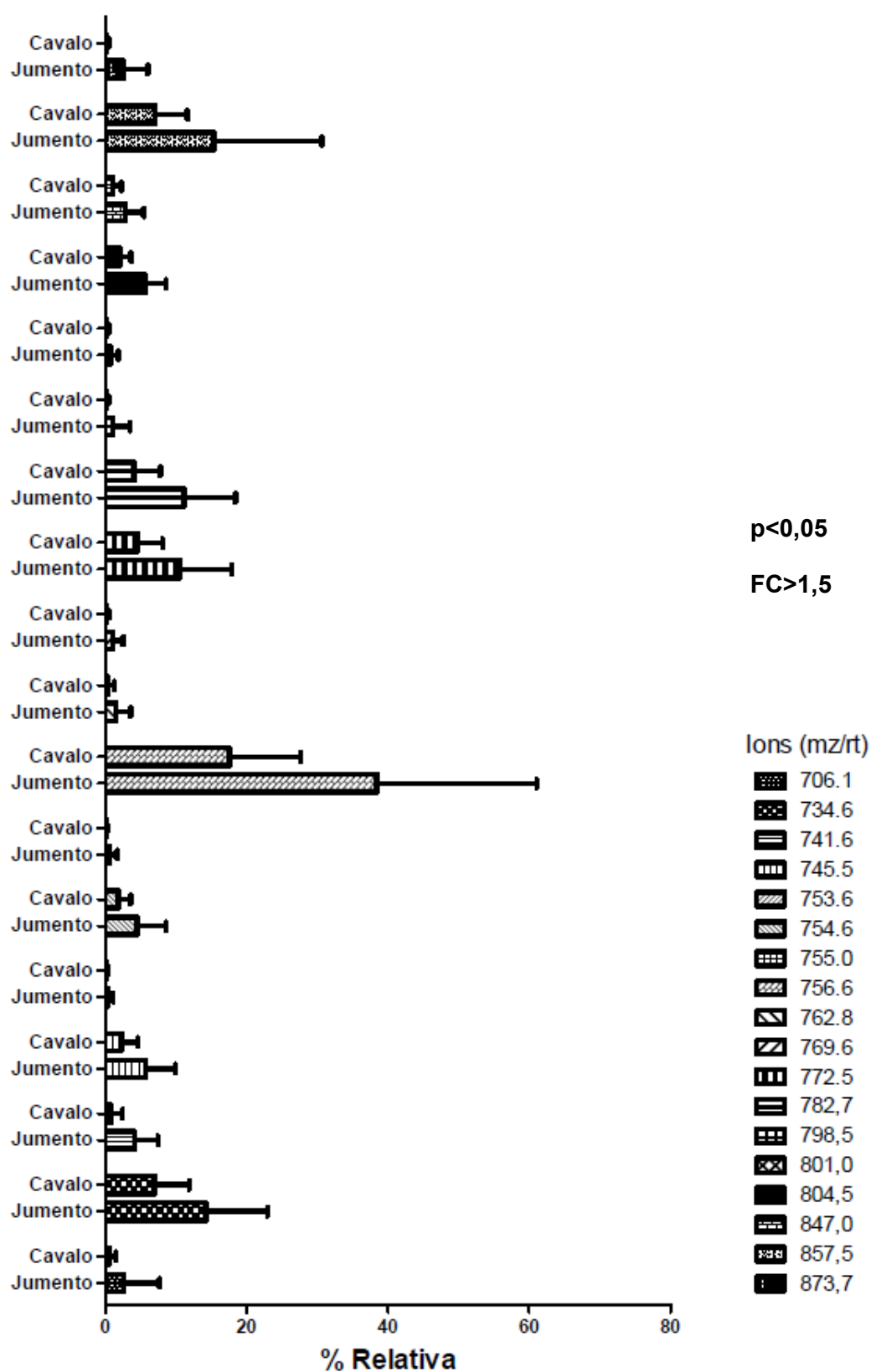


Figura 4: Representação gráfica dos íons lipídicos que apresentaram maior abundância relativa na membrana espermática de jumentos em relação aos de cavalos.

Os fosfolipídeos são identificados por uma abreviação PC (fosfatidilcolina), SM (esfigomielina), PE (fosfatidiletanolamina) ou TAG (triacilglicerol), seguida pelo total de carbonos e duplas ligações (C:dupla ligação). Os principais íons identificados nos espectros estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores dos lipídeos de maior abundância relativa em relação a massa-carga (m/z), fórmula molecular (Fosfolipídios), referência bibliográfica da identificação do íon (Referência) de espermatozoides a fresco de cavalos e jumentos.

Maior abundância espécie	m/z	Fosfolipídeos (carbonos: insaturações)	Referências
Cavalo	705.7	Não identificado	
Cavalo	717.5	$[PA (36:5) + 2H + Na]^+$	23
Cavalo	723.7	Não identificado	
Cavalo	772	Não identificado	
Cavalo	835	Não identificado	
Cavalo	836	Não identificado	
Cavalo	837.8	Não identificado	
Cavalo	851	Não identificado	
Cavalo	876	Não identificado	
Cavalo	881	Não identificado	
Jumento	706.1	$[PC (30:3) + H]^+$	22
Jumento	734.6	$[PC (32:0) + H]^+$	22
Jumento	741.6	Não identificado	
Jumento	745.5	$[PA (36:2) - H + 2Na]^+$	23
Jumento	753.6	$[SM(18:0) + Na]^+$	24
Jumento	754.6	$[PC (32:1) + Na]^+$	24
Jumento	755	Não identificado	
Jumento	756.6	$[PC (32:0) + Na]^+$ e/ou $[PC (34:3) + H]^+$	22, 24, 13
Jumento	762.8	$[PE (34:1) - H^+ + 2Na]^+$	22
Jumento	769.6	$[PC (38:6) + Na]^+$ com perda $(CH_3)_3$	25
Jumento	772.5	$[PCp (36:1) + H]^+$, $[PCe (36:2) + H]^+$	23
Jumento	782.7	Não identificado	
Jumento	798.5	$[PC (34:1) + K]^+$	25
Jumento	801	Não identificado	

Jumento	804.5	[PC (38:7) + H] ⁺ , [PC(36:4)+ Na] ⁺	13
Jumento	847	Não identificado	
Jumento	857.5	[PPS (50:0)+H] ⁺	26
Jumento	873.7	Não identificado	

PA = ácido fosfatídico, PG = fosfatidilglicerol, PC = fosfatidilcolina; SM = esfingomielina; PE = fosfatidiletanolamina; TAG = triacilglicerol; PCe subspecies = plasmanyol e PCp subspecies = plasményl.

DISCUSSÃO

Atualmente, a espécie asinina utiliza quase que exclusivamente as biotecnologias da reprodução desenvolvidas para os equinos, entretanto os resultados de fertilidade muitas vezes são bem distintos com valores inferiores para os jumentos. Porém, ao se comparar o sêmen a fresco destas duas espécies, pode-se verificar valores similares ou até mesmo superiores para as características de cinética e integridade espermática nos garanhões asininos. Nesse sentido, a investigação de particularidades morfofuncionais dos espermatozoides de jumentos pode direcionar o desenvolvimento de técnicas de processamento do sêmen mais adequadas a esta espécie.

Poucos trabalhos, ainda hoje, se propuseram a verificar o perfil lipídico da membrana espermática, principal estrutura do espermatozoide que através de sua interação com o meio externo, confere a esta célula única, sua viabilidade. Alguns autores compararam a lipidômica espermática de espécies similares e verificaram diferenças importantes entre elas [11,13, 30].

No presente estudo pode verificar que os animais utilizados apresentavam características de cinética e integridade espermática muito próximas, apesar de algumas diferenças estatísticas nos parâmetros de motilidade total e progressiva, VAP e espermatozoides rápidos, com valores superiores no sêmen de jumentos. Ambos os grupos estudados demonstraram qualidade espermática condizente com a obtenção de índices

de fertilidade similares. Estes valores corroboram com os trabalhos de Miró et al., [27], Miro et al., [28] e Rota et al., [29].

Apesar da boa qualidade espermática do sêmen a fresco destas duas espécies, sabe-se que a resposta destas amostras ao processo de criopreservação é bem distinto. A espécie asinina apresenta qualidade espermática inferior de armazenamento quando comparada aos equinos com mesma viabilidade antes do processamento. [7, 8, 11, 27, 29]. Assim sendo, vê-se a necessidade de adaptações as biotécnicas hoje utilizadas para o armazenamento do sêmen desta espécie as suas peculiaridades, como diluidores, taxas e curvas de refrigeração específicos que promovam uma melhora das caracterisitcas espermática após o processamento.

Um fator que pode explicar essa distinção de qualidade frente ao processamento pode estar relacionado à composição lipídica da membrana espermática. Nesse sentido, trabalhos têm sido realizados para caracterizar o perfil lipídico da membrana dos espermatozoides em diferentes espécies (homens [30], suínos [30], bovinos [26] e felinos [13]), pois a composição específica de lipídeos e ácidos graxos da membrana é importante para entender os mecanismos das diferenças de respostas à refrigeração e congelamento do sêmen entre os indivíduos [18], uma vez que a composição dos ácidos graxos está diretamente relacionada à sua resistência à criopreservação [11].

Os espermatozoides de jumentos demonstraram maior abundância relativa de 18 fosfolipídeos na membrana em relação aos espermatozoides de cavalos. A maior parte desses fosfolipídeos é insaturado, ou seja, apresentavam duplas ligações em sua estrutura, conferindo a membrana uma maior fluidez, o que a temperatura ambiente possa ser uma fator benéfico, entretanto pode torná-la mais vulnerável a peroxidação lipídica com a queda da temperatura [11, 16]. A fase de transição da membrana durante a criopreservação se mostra como uma das fases de maior lesão à célula espermática, quando efetuada de maneira inadequada. Esse fenômeno pode explicar a maior susceptibilidade a danos espermáticos decorrentes de processos de criopreservação que a espécie asinina apresenta em relação à espécie equina [7, 9].

Em relação às características lipídicas dos espermatozoides em diferentes espécies, Fuchs et al [13] verificaram que a composição de fosfolipídeos da membrana do espermatozoide de bovinos apresenta uma composição relativamente mais simples comparada a de felinos que apresentam uma complexidade de fosfolipídeos, podendo este ser um fator determinante para o sucesso no processamento do sêmen dos touros em relação aos felídeos.

Ramires Neto [19] comparou o perfil lipídico da membrana espermática de cavalos da raça Mangalarga Marchador e Quarto de Milha, no qual os cavalos Mangalargos apresentaram maior abundância em três fosfolipídeos sendo a raça mais sensível aos danos espermáticos, pois a diferença existente entre os tipos e quantidade de fosfolipídeos pode representar a instabilidade da membrana espermática durante os processos de criopreservação, principalmente por alterar a fluidez [18]. O que pode explicar a variação dos resultados do sêmen criopreservado de jumentos [31, 32].

A fosfatidilcolina (PC) e a esfingomielina (SM) são unidades estruturais de membranas e sua presença determina as propriedades físico-químicas da membrana celular, incluindo permeabilidade, fluidez e comportamento da fase de transição [33]. A PC foi o fosfolipídeo mais encontrado na membrana do espermatozoide de jumentos, corroborando com autores que comprovaram que este fosfolipídeo está presente nas bicamadas das membranas de animais, devido a sua estrutura polar-apolar que favorecem a organização das moléculas em bicamadas. Proporciona fluidez da membrana e é um dos principais substratos para a fosfolipase D, enzima responsável por inúmeros eventos celulares, como: o rearranjo do citoesqueleto, formação e transporte de vesículas [11, 34, 35]. Estudos demonstraram que perturbações na homeostase da PC podem levar a célula à morte [34].

O ácido fosfatídico (PA) também foi encontrado na membrana do espermatozoide de jumentos, apesar de não ser um fosfolipídeo abundante, é extremamente importante como intermediário na biossíntese de trigliceróis e fosfolipídeos e como molécula sinalizadora, podendo surgir

por hidrólise enzimática durante condições impróprias de armazenamento [36].

A tolerância criogênica está relacionada à presença de altos níveis dos ácidos docosahexaenóico (22:6) e docosapentaenóico (22:5) como observado em estudo comparando raças diferentes de elefantes [37]. Os autores observaram que o sêmen de elefante africano pode ser criopreservado com resultados satisfatórios de fertilidade enquanto espermatozoides de elefantes asiáticos, que apresentam baixos níveis desses ácidos graxos, são sensíveis ao processo de criopreservação.

Fenômeno semelhante foi reportado em relação ao espermatozoide de diferentes raças de raposa, no qual o espermatozoide de raposa prateada (*Vulpes vulpes*) apresentou altos níveis de ácido docosapentaenóico (22:5, n-6) na membrana quando comparado a espermatozoides de raposa azul (*Alopex lagopus*). Os espermatozoides da raposa azul não apresentam resultados de fertilidade após o processo de congelação [12]. Corroborando com Schiller et al [26] que identificaram altos níveis de ácido docosahexaenóico (22:6) em espermatozoides de bovinos, o qual pode ser criopreservado, em relação ao espermatozoide de suínos [30].

Além disso, Gulaya et al., [38] observaram correlação positiva entre níveis de ácido docosahexaenóico da membrana de espermatozoides de humanos e motilidade espermática, pois os ácidos docosahexaenóico e docosapentaenóico são importantes para o desenvolvimento da motilidade e tolerância a criopreservação. De acordo com Miller et al [14] membranas de espermatozoides ricas em ácidos graxos poliinsaturados tendem a ser mais fluidas quando comparada a membranas ricas em ácidos graxos saturados, porém uma pequena diminuição da fluidez da membrana parece ser importante para a tolerância criogênica.

Adicionalmente, a diferença do perfil de fosfolípidos das membranas espermáticas entre as duas espécies estudadas pode estar relacionada a fatores genéticos e ambientais. Sudano et al. [39] observaram diferenças lipídicas entre o embrião de vacas Nelore e Simental e atribuíram como possível causa desta diferença a origem dos animais Simentais, naturalmente selecionados em países de baixas temperaturas, o que pode

ter determinado o grau mais elevado de fosfolípidos insaturados presentes em embriões dessa raça. O que pode ser atribuído às espécies do presente trabalho, pois a seleção da raça dos jumentos estudados foi feita em clima tropical, enquanto a raça de cavalos foi selecionada em clima temperado.

Nesse sentido, as diferenças da composição da membrana espermática de jumentos e cavalos podem ser atribuídas a origem de seleção de cada espécie e as adaptações dos espermatozoides para a fertilização, assim como Fuchs et al [13] explicou as diferenças encontradas quando compararam composição lipídica da membrana espermática em diferentes espécies animais. A informação detalhada da composição lipídica da membrana do espermatozoide é necessária para aperfeiçoar as biotecnologias aplicadas à espécie asinina, abrindo campo de estudos para diferenciar o processamento do sêmen de cavalos e jumentos.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que a composição lipídica da membrana do espermatozoide de jumentos e cavalos apresentam diferenças marcantes, demonstrando a necessidade do desenvolvimento de biotécnicas específicas adequadas a cada espécie. Nesse sentido, novos estudos nessa linha são necessários para verificar a influência dos diferentes lipídeos frente aos processamentos espermáticos da espécie asinina.

REFERÊNCIAS

- [1] Canisso, I.F.; Carvalho, G.R.; Davies Morel, M.C.G.; Guimarães, G.R.;McDonnell, S.M. Sexual behavior and ejaculate characteristics in Pêga donkeys (*Equus asinus*) mounting estrous horse mares (*Equus caballus*). *Theriogenology*, v.73, p.56-63, 2010.
- [2] Gastal, M.O.; Henry, M.; Beker, A.R. Effect of ejaculation frequency and season on donkey jack semen. *Theriogenology*, v.47, p.627-638, 1997.
- [3] Gloria, A.; Contri, A.; De Amicis, I.; Robbe, D.; Carluccio, A. Defferences between epididymal and ejaculate sperm characteristics in donkey. *Anima Reproduction Science*, v.128, p.117-122, 2011.
- [4] Henry, M.; Lago, L.A.; Mendonça, L.F. Donkeys: a specie with own social and reproductive characteristics. *Rev.Bras.Reprod.Anim.*, v.33, p.223-230, 2009.
- [5]
- [6] McDonnell, S.M. Reproductive behavior of donkeys (*Equus asinus*). *Animal Behaviour Science*, v.60, p.277-282, 1998.
- [7] Mello, S.L.V.; Henry, M.; Souza, M.C. Effect of split ejaculation and seminal extenders on longevity of donkey semen preserved at 5°C. *Arq.Bras.Med.Vet.Zoot.* v.52, p.372-378, 2000.
- [8] Oliveira, J. V.; Alvarenga, M. A.; Melo, C. M.; Macedo, L. M.; Dell'Aqua, J. A. Jr.; Papa, F. O. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Anim Reprod Sci.* v. 94, p. 82-84, 2006.
- [9] Rota, A.; Magalli, C.; Panzani, D.; Camillo, F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiata donkey spermatozoa. *Theriogenology*. v. 69, p. 176-185, 2008.
- [10] Am-in, N.; Kirkwood, R.N.; Techakumphu, M.; Tantasuparuk, W. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. *Theriogenology*, v.75, p.897-903, 2011.

- [11] Parks, J. E.; Lynch, D. V. lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v.29, p.255-266, 1992.
- [12] Miller Jr., 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 cryopreservation. *Cryobiology*, v.51, p.66-75, 2005.
- [13] Fuchs, B.; Jakop, U.; Gortiz, F.; Hermes, R.; Hilderbrandt, T.; Schiller, J.; Muller, K. MALDI-TOF “fingerprint” phospholipid mass spectra allow the differentiation between *ruminantia* and *feloideae* spermatozoa. *Theriogenology*, v. 71, p. 568-575, 2009.
- [14] Miller, R.R.; Sheffer, C.J.; Cornett, R.; McClean, R.; MacCallum, C.; Johnston, S.D. Sperm membrane fatty acid composition in the Eastern grey kangaroo (*Macropus giganteus*), koala (*Phascolarctos cinereus*), and common wombat (*Vombatus ursinus*) and its relationship to cold shock injury and cryopreservation success. *Cryobiology*, v.49, p.137-148, 2004
- [15] Schiller, J.; Arnhold, J.; Gander, H. J.; Arnold, K. Lipid analysis of human spermatozoa and seminal plasma by MALDI-TOF mass spectrometry and NMR spectroscopy – effects of freezing and thawing. *Chemistry and Physics of Lipids*, v.106, p.145-156, 2000.
- [16] Zalata, A.A.; Christophe, A.B.; Depuydt, E.; Schonjans, F.; Comhaire, F.H. The fatty acid composition of phospholipids on spermatozoa from infertile patients. *Molecular human reproduction*, v.4, p.111-118, 1998.
- [17] Muller, K.; Pomorski, T.; Muller, P.; Hermann, A. Stability of transbilayer phospholipid asymmetry in viable ram sperm cells after cryotreatment. *Journal of Cell science*, v.112, p.11-20, 1999.
- [18] Garcia, 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.

[19] Ramires Neto, C. Perfil lipídico da membrana plasmática e alterações morfofuncionais de espermatozoides de garanhões resistentes e sensíveis à criopreservação. Botucatu, SP: Universidade Estadual Paulista, FMVZ, 2015, 130p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), 2015.

[20] Harrison, R.A.P.; Vickers, S.E. Use of fluorescent probes to access membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert*, v.88, n.1, p.343-352, 1990.

[21] Bligh, E. G.; Dyer, J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification, *Biochem. Can. J. Physiol.* v.37, p.911–917, 1959.

[22] Milne S. et al. Lipidomics: an analysis of cellular lipids by ESI-MS. *Methods*, v.39, p.92-103, 2006.

[23] Petkovic, M.; Schiller, J.; Müller, M.; Bernard, S.; Reichl, S.; Arnold; K.; Arnhold, J. 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 Bioch*, v.289, p.202-206, 2001.

[24] Brugger, B.; Erben, G.; Sandhoff, R.; Wieland, F.T.; Lehmann, W.D. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.94, p.2339–2344, 1997.

[25] Hasayaka T, Goto-Inoue N, Sugiura Y, Zaima N, Nakanishi H, Ohishi K, Nakanishi S, Naito T, Taguchi R, Setou M. Matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight (MALDI-QIT-TOF)-based imaging mass spectrometry reveals a layered distribution of phospholipid molecular species in the mouse retina. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.22, p.3415-3426, 2008.

[26] Schiller, J.; Müller, K.; Süß, R.; Arnhold, J.; Gey, C.; Herrmann, A.; Leßig J.; Arnold, K.; Müller, P. Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa

by MALDI-TOF mass spectrometry - a cautionary note. *Chem Phys Lip*, v.126, p.85–94, 2003.

[27] Miró, J.; Lobo, V.;Quintero-Moreno, A.; Medrano, A.; Peña, A.; Rigau, T. Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology*. v. 63, p. 1706-1716, 2005.

[28] Miró, J.; Taberner, A.; Rivera, M.; Peña, A.; Medrano, A.; Rigau, T.; Peñalba, A. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology*, v.72, p.1017-1022, 2009.

[29] Rota, A.; Panzani, D.; Sabatini, C.; Camillo, F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*, v. 78, p. 1846-1854, 2012.

[30] Leßig J., C. Gey, R. Süß, J. Schiller, H.-J. Glander & J. Arnhold: Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and ³¹P NMR spectroscopy. *Comp Biochem Physiol B* 137, 265-277, 2004.

[31] Trimiche, A.; Renard, P.; Le Lannou, D. Improvement of motility of post-thaw Poitou jackass sperm using glutamine. *Theriogenology*, v.45, p.1015-1027, 1996.

[32] Flores, E.; Taberner, e.; Rivera, M.M.; Paña, A.; Rigau, T.; Miró, J.; Rodríguez-Gil, J.E. Effects os freezing / thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology*, v.70, p.936-945, 2008.

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

- [34] Hattori, H.; Kanfer, J.N. Synaptosomal phospholipase D: potential role in providing choline for acetylcholine synthesis. *Biochem res Commun*, v.124, p. 945-949, 1984.
- [35] Jager, R.; Purpura, M.; Kingsley, M. Phospholipids and sports performance. *Journal of the international Society of Sports Nutrition*, v.4, p.1-8, 2007.
- [36] McKee, T.; McKee, J.R. *The molecular basis of life*. 3 ed. New York. McGraw-Hill, p.200-233, 2003.
- [37] Swain, J.E.; Miller Jr, R.R. A prosteryogenic comparison of membrane fatty acids of elephant spermatozoa. *Zoo Biol*, v.19, p.461-473, 2000.
- [38] Gulaya, N.M.; Margitich, V.M.; Govseeva, N.M.; Klimashevsky, V.M.; Goroyunchenko, I.I.; Boyko, M.I. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. *Arch Androl.*, v.46, p. 169-175, 2001.
- [39] Sudano, M. J.; Santos, V. G.; Tata, A.; Ferreira, C. R.; Paschoal, D. M.; Machado, R.; Buratini, J.; Eberlin, M. N.; Landim-Alvarenga, F.D. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro- and in vivo-produced blastocysts. *Biol Reprod*, v.87, p.130, 2012.

CAPÍTULO 3

Trabalho a ser enviado para a revista *Cryobiology*

Alterações do perfil lipídico dos espermatozoides de jumento (*Equus Asinus*) durante a criopreservação

Maria Manoela de Castro Chaves¹, Carlos Ramires Neto¹, Katia Roberta Belaz², Davila Zampieri², Alessandra Tata², Marcos Nogueira Eberlin², Mateus José Sudano³, Marco Antonio Alvarenga¹, Frederico Ozanam Papa¹, Camila de Paula Freitas Dell'Aqua¹, José Antonio Dell'Aqua Júnior¹

¹ Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu -
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária.

² Laboratório ThoMSon de Espectrometria de Massas, Instituto de Química da
Universidade Estadual de Campinas

³ Curso de Veterinária da Universidade Federal do Pampa

RESUMO

Preservar a integridade da membrana plasmática do espermatozoide é fundamental para manter a capacidade fertilizante, especialmente após processos desgastantes como a criopreservação. A congelação e refrigeração causam às membranas desestabilização, rearranjo, perda e peroxidação dos lipídeos. A membrana plasmática funciona como uma barreira física ao ambiente externo e a sua integridade estrutural está diretamente relacionada ao tipo e quantidade de lipídeos que a compõem. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi verificar as alterações do perfil lipídico da membrana dos espermatozoides de jumentos causadas pelos processos de criopreservação. Foram utilizados ejaculados de sete jumentos da raça Pêga, a análise do perfil lipídico foi realizada por espectrometria de massa MALDI-MS antes e após os processos de criopreservação. O processo de refrigeração a 5°C resultou em perda de 14 íons lipídicos e o de congelamento em apenas um íon. E 16 íons que não foram identificados antes do processo estavam presentes na membrana dos espermatozoides após a refrigeração a 5°C. De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que os processos de

criopreservação levam a alterações na composição de fosfolipídeos da membrana plasmática de espermatozoides de jumentos.

Palavras-chave: membrana, refrigeração, congelação, sêmen, jumento.

INTRODUÇÃO

A utilização de sêmen refrigerado e congelado em programas de inseminação artificial (IA) em asininos é uma ferramenta para aumentar a expressão genética [1] e reduzir o número de inseminações por ciclo [2]. O uso de sêmen refrigerado em cavalos tem sido investigado há muitos anos e se tornou uma técnica de rotina na indústria equina, apresentando boas taxas de fertilidade e baixo custo [3,4,5].

Entretanto, poucos estudos foram realizados com sêmen refrigerado de asininos [6, 7, 2]. Alvarez et al [8] observaram baixa fertilidade do sêmen refrigerado de jumentos à 15°C com diluente a base de leite. A congelação de sêmen de asininos apresenta ótimos resultados de fertilidade em éguas, porém a taxa de fertilidade em jumentas é muito baixa [9]. Rota et al.,[10] verificaram maior taxa de fertilidade quando adicionou-se plasma seminal autólogo no sêmen descongelado.

O processo de criopreservação de sêmen, que incluem a congelação e refrigeração, causam danos às membranas espermáticas [11], com desestabilização da membrana, rearranjo dos lipídios [12], perda de lipídios da membrana [13] e peroxidação dos lipídios pela formação das espécies reativas [14]. A membrana plasmática funciona como uma barreira física ao ambiente externo [15] e a sua integridade estrutural está diretamente relacionada ao tipo e quantidade de lipídios que a compõem [16].

Durante o processo de criopreservação, o resfriamento rápido dos espermatozoides de 20°C a 5°C induz danos irreversíveis nas membranas espermáticas, que é caracterizado pela perda de lipídios da membrana para o meio extracelular e a subsequente perda de íons e moléculas intracelulares. Este fenômeno chamado de "choque- frio" ocasiona uma redução do metabolismo celular e perda rápida de motilidade resultando em perda da viabilidade dos espermatozoides [17]. O tipo de fosfolipídios e a quantidade de proteínas presentes na membrana plasmática influenciam na sensibilidade

ao choque térmico, sendo que espécies que apresentam maior proporção de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina são mais resistentes [18].

A composição de lipídios das membranas espermáticas e o conhecimento dos lipídios que são fisiologicamente perdidos durante a criopreservação possibilita aprimorar as técnicas e meios diluentes, contribuindo assim para uma melhor taxa de fertilidade do sêmen criopreservado de jumentos. Desta maneira, o objetivo do presente estudo foi verificar as alterações do perfil lipídico da membrana dos espermatozoides de jumentos causadas pelos processos de criopreservação.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita de sêmen

Foram utilizados ejaculados de sete jumentos da raça Pêga com idade entre 7 e 15 anos, alojados em haras nos estados de São Paulo. Os animais selecionados apresentaram qualidade espermática dentro dos padrões para a espécie (Motilidade total >60% e motilidade progressiva >20%) e histórico de alta fertilidade (>70%) do sêmen fresco. O experimento foi aprovado pelo Comitê de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Campus Botucatu (Protocolo 39/2015-CEUA).

O sêmen foi colhido com vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e posteriormente filtrado em filtro de nylon (Minitub[®], Alemanha) para remoção da fração gel. A concentração espermática foi aferida por câmara de Neubauer e uma alíquota de 50×10^6 de espermatozoides foi removida em duplicata (diluída com diluente a base de leite e outra a base de gema de ovo), disposta em criotubo e congelada em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior avaliação do perfil lipídico.

A seguir, uma fração do ejaculado foi diluída com meio diluente comercial à base de leite desnatado (Botu-sêmen[®], Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) na proporção de 1:1 (v/v). Essa amostra foi dividida em duas alíquotas, sendo uma destinada à congelação e outra à refrigeração.

Refrigeração e congelação do sêmen

Para a congelação, o sêmen foi centrifugado a 600 x g por 10 minutos [19]. O sobrenadante foi desprezado e o "pellet" ressuspensionado em meio de congelação Botucio (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) na concentração de 200×10^6 espermatozoides/mL. Após o envase em palhetas de 0,5 mL, as mesmas foram levadas ao refrigerador de temperatura controlada (Minitub, Alemanha) e permaneceram à 5°C por 20 minutos. Posteriormente, foram acomodadas sobre uma plataforma metálica em caixa isotérmica com capacidade de 45 litros, preenchida com nitrogênio líquido (N₂) até 3,5 cm de altura. As palhetas ficaram dispostas horizontalmente a 6,0 cm do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos e posteriormente foram armazenadas em botijão de nitrogênio [20]. As palhetas descongeladas à 37°C por 20 segundos.

Para a refrigeração, uma fração do ejaculado foi acrescida de diluente comercial à base de leite desnatado (Botu-sêmen®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) a uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. As amostras de sêmen foram mantidas em sistema comercial de refrigeração passivo (Botu-Flex®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) pelo período de vinte e quatro horas à 5°C.

Análise do sêmen

Análise computadorizada da cinética espermática

Foi realizada análise dos parâmetros de cinética espermática do sêmen fresco diluído e após a refrigeração e congelação pelo método computadorizado CASA, quanto a motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade linear progressiva (VSL, µm/s) e espermatozoides rápidos (RAP, %). A configuração do equipamento de CASA está descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Configuração do equipamento de CASA utilizado nas análises.

CARACTERÍSTICAS	AJUSTE
Número de pontos examinados	30

Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células imóveis	30 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	80 %
Referência para velocidade média (VAP)	<70 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VAP)	<30 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VSL)	<20 $\mu\text{m/s}$
Tamanho da cabeça estática	0,62 – 2,98 pixels
Intensidade da cabeça estática	0,24 – 1,19
Elongação da cabeça estática	100 - 0%
Lentos contados como móveis	Não
Magnificação	1,95

Integridade de membrana por microscopia de epifluorescência

A análise da integridade de membrana plasmática (IMP) do sêmen fresco diluído, refrigerado por 24 horas e descongelado, foi realizada pela técnica de microscopia de epifluorescência (Leica Microsystem – DMLB, Ernst-Leitz-Strabe, Wezlar Germany), utilizando-se a associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídeo (IP) segundo metodologia de Harrison e Vickers [21]. Nessa análise 100 células foram contadas, sendo os espermatozoides corados integralmente em verdes considerados íntegros e os espermatozoides corados em vermelho ou em verde e vermelho, considerados lesados.

Perfil Lipídico da membrana plasmática

A análise do perfil lipídico foi realizada por espectrometria de massa

MALDI-MS no sêmen fresco (adicionado de diluente a base de leite), no sêmen após a refrigeração, no sêmen antes da congelação e no sêmen após o descongelamento. As análises foram realizadas no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, na Universidade Estadual de Campinas.

A extração dos lipídios foi realizada pelo protocolo estabelecido por Bligh e Dyer [22]. A alíquota contendo os espermatozoides foi descongelada em temperatura ambiente e diluída com 1 mL de solução de PBS sem cálcio e magnésio. A mesma foi homogeneizada durante 3 minutos e centrifugada à 12000xg por 1 minuto. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e novamente as células foram lavadas. O sobrenadante foi descartado e 0,5 mL de uma solução de clorofórmio/metanol ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, 1:2) foi adicionada e homogeneizada durante 5 minutos. Uma nova centrifugação à 5000xg por 3 minutos foi realizada e a fase inferior foi removida e criopreservada a -196°C até a análise por espectrometria de massa.

O volume de 1 μL do extrato lipídico foi adicionado sobre a placa MALDI e após a cristalização adicionou-se 1 μL da solução de DHB (30 mg em 1 mL de metanol). Os espectros foram adquiridos em modo positivo utilizando MALDI-MS Autoflex III por tempo de voo, equipado com tecnologia laser smartbeamTM (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os dados de MS foram adquiridos na faixa de m/z entre 700 e 1000 em média 1.500 disparos consecutivos de laser com uma frequência de 200 Hz. FlexAnalysis Software 3.0 foi utilizado para visualizar e processar os espectros de massas.

As estruturas dos fosfolipídios foram atribuídas baseada na busca da literatura e a base de dados (<http://lipidsearch.jp> ou www.lipidmaps.org).

Análise estatística

Para a análise estatística da comparação da cinética espermática, citometria de fluxo e microscopia de epifluorescência foi utilizado teste t, considerando significativo $p \leq 0,05$. Para o perfil lipídico foram utilizados modelos uni e multivariados. Os valores foram substituídos pela metade do valor mínimo positivo nos dados obtidos a partir do pré-processamento. Os valores de intensidade de cada pico nos espectros foram auto-dimensionado (média-centrada e dividido pelo desvio padrão de cada variável), a fim de dar a mesma importância para cada valor em m/z. As análises foram realizadas

utilizando o MetaboAnalyst 2,0, a análise discriminante dos quadrados mínimos parciais (PLS-DA), mostrando a relação entre a variância nos dados e as diferenças entre os grupos. As espécies de lípidos foram diferencialmente expressos identificados utilizando ANOVA seguido pelo teste de Tukey. *Vulcano plot* foi usado para comparar dois grupos, usando os seguintes critérios: valores de $p \leq 0,05$ e *fold-change* (FC) $\geq 1,5$. Agrupamento hierárquico da espécie lipídica diferencialmente expressos foi realizada usando distâncias euclidianas ligações Ward foram utilizados para mostrar relação entre as amostras e funcionalidades.

RESULTADOS

Cinética e integridade da membrana espermática

Os parâmetros de cinética espermática e integridade da membrana plasmática das amostras de sêmen fresco, refrigerado e congelado estão descritos nas tabelas 2 e 3.

Todos os parâmetros avaliados apresentaram diferença estatística entre os momentos fresco e refrigerado a 5°C por 24 horas (Tabela 2), bem como entre os momentos antes e após a congelação, para todas as variáveis avaliadas ($p < 0,05$).

Tabela 2: Valores médios e desvios padrão da cinética espermática e da integridade da membrana plasmática do sêmen fresco e refrigerado a 5°C por 24 horas de jumentos.

Grupo	MT(%)	MP(%)	VAP($\mu\text{m/s}$)	VSL($\mu\text{m/s}$)	RAP(%)	IMP(%)
Fresco	82,6 $\pm$ 7,9 ^a	55,0 $\pm$ 5,7 ^a	130,7 $\pm$ 17,2 ^a	109,9 $\pm$ 16,8 ^a	75,9 $\pm$ 9,3 ^a	73,6 $\pm$ 8,5 ^a
5°C	37,3 $\pm$ 11,8 ^b	17,3 $\pm$ 11,8 ^b	83,8 $\pm$ 7,1 ^b	65,5 $\pm$ 8,8 ^b	23,2 $\pm$ 8,4 ^b	39,7 $\pm$ 10,7 ^b

^{ab}Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, $p < 0,05$.

MT = motilidade total, MP = motilidade progressiva, VAP = velocidade de trajeto, VSL = velocidade retilínea, RAP = espermatozoides rápidos e IMP = integridade de membrana plasmática.

Tabela 3: Valores médios e desvios padrão da cinética espermática e da integridade da membrana plasmática do sêmen fresco e descongelado (Descong) de jumentos.

Grupo	MT(%)	MP(%)	VAP($\mu\text{m/s}$)	VSL($\mu\text{m/s}$)	RAP(%)	IMP(%)
Fresco	78,1 $\pm$ 10,7 ^a	40,3 $\pm$ 7,9 ^a	114,3 $\pm$ 13,9 ^a	89,6 $\pm$ 11,1 ^a	66,9 $\pm$ 13,3 ^a	63,4 $\pm$ 21,9 ^a
Descong	37,6 $\pm$ 24,5 ^b	18,0 $\pm$ 14,4 ^b	85,1 $\pm$ 9,5 ^b	71,6 $\pm$ 7,7 ^b	26,9 $\pm$ 21,1 ^b	26,0 $\pm$ 13,8 ^b

^{ab}Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si, $p < 0,05$.

MT = motilidade total, MP = motilidade progressiva, VAP = velocidade de trajeto, VSL = velocidade retilínea, RAP = espermatozoides rápidos e IMP = integridade de membrana plasmática.

Lipidômica do sêmen refrigerado

A análise de fosfolipídeos do sêmen fresco e refrigerado 24 horas a 5°C identificou 112 íons, sendo 82 comuns aos dois grupos. Os espermatozoides antes da refrigeração apresentaram 96 íons e 24 horas após a refrigeração foram identificados 98 íons lipídicos (Tabela 4).

O processo de criopreservação a 5°C resultou em perda de 14 íons lipídicos de massa carga (m/z) 709.7, 736.0, 739.0, 756.0, 760.0, 762.0, 788.0, 816.0, 843.0, 855.0, 865.0, 867.0, 879.0 e 881.0. E 16 íons que não foram identificados antes do processo estavam presentes na membrana dos espermatozoides após a refrigeração a 5°C (m/z 705.7, 727.0, 734.7, 737.0, 755.0, 759.0, 774.7, 794.8, 798.0, 811.0, 816.8, 841.7, 859.0, 866.0, 876.0 e 880.0).

Tabela 4: Valores da quantidade total de íons lipídicos, íons exclusivos de cada grupo, íons com maior abundância comuns aos grupos, íons identificados e íons não identificados, encontrados nos espermatozoides a fresco e refrigerados a 5°C por 24 horas de jumentos.

	Fresco	Refrigerado
Total	96	98
Exclusivos	14	16
Maior abundância entre os comuns	28	14
Íons identificados	18	10
Íons não identificados	10	4

A representação de espectros dos fosfolipídios encontrados na membrana espermática do sêmen fresco e refrigerado a 5°C, obtidos por MALDI-MS, estão representados na Figura 1.

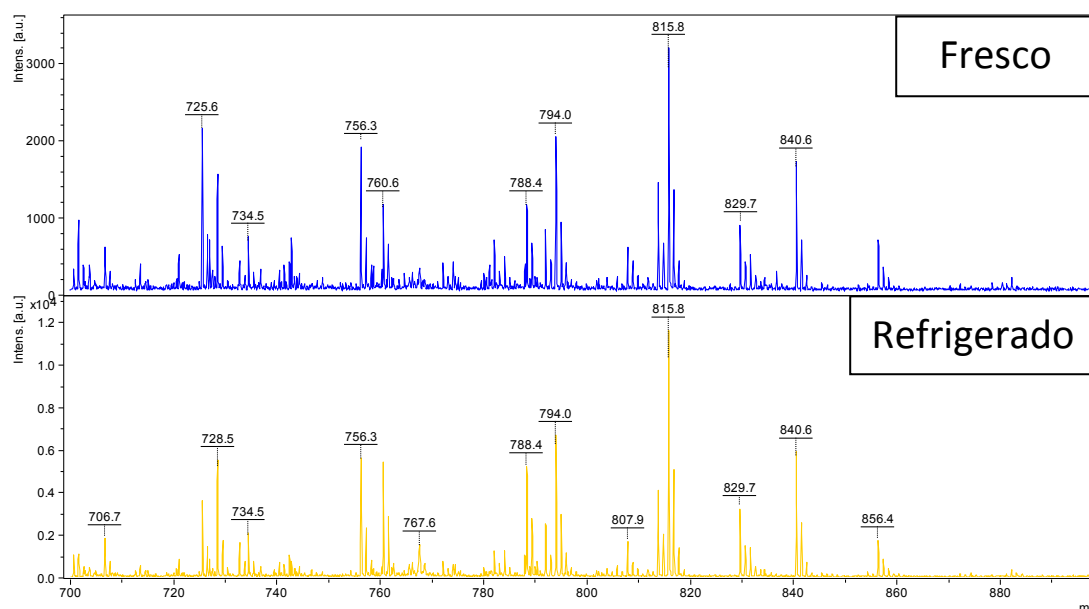


Figura 1: Exemplos representativos de espectros de massas dos perfis de fosfolipídeos da membrana espermática do sêmen fresco e refrigerado a 5°C por 24 horas.

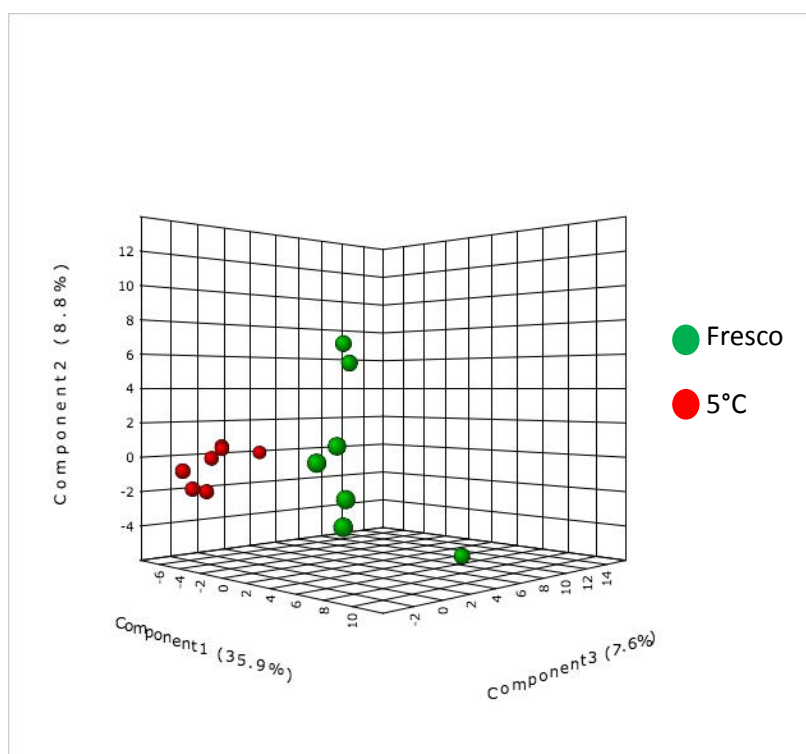


Figura 2: Representação gráfica da diferença do perfil de fosfolipídeos, analisado por PLS-DA, entre os momentos antes e após a refrigeração (5°C por 24 horas) do sêmen de jumentos.

As Figuras 3a, 3b e 4 representam os íons lipídicos que apresentaram maior abundância relativa ($FC > 1,5$ e $p < 0,05$) antes do processo de criopreservação (28 íons) e após a refrigeração a 5°C (14 íons), respectivamente.

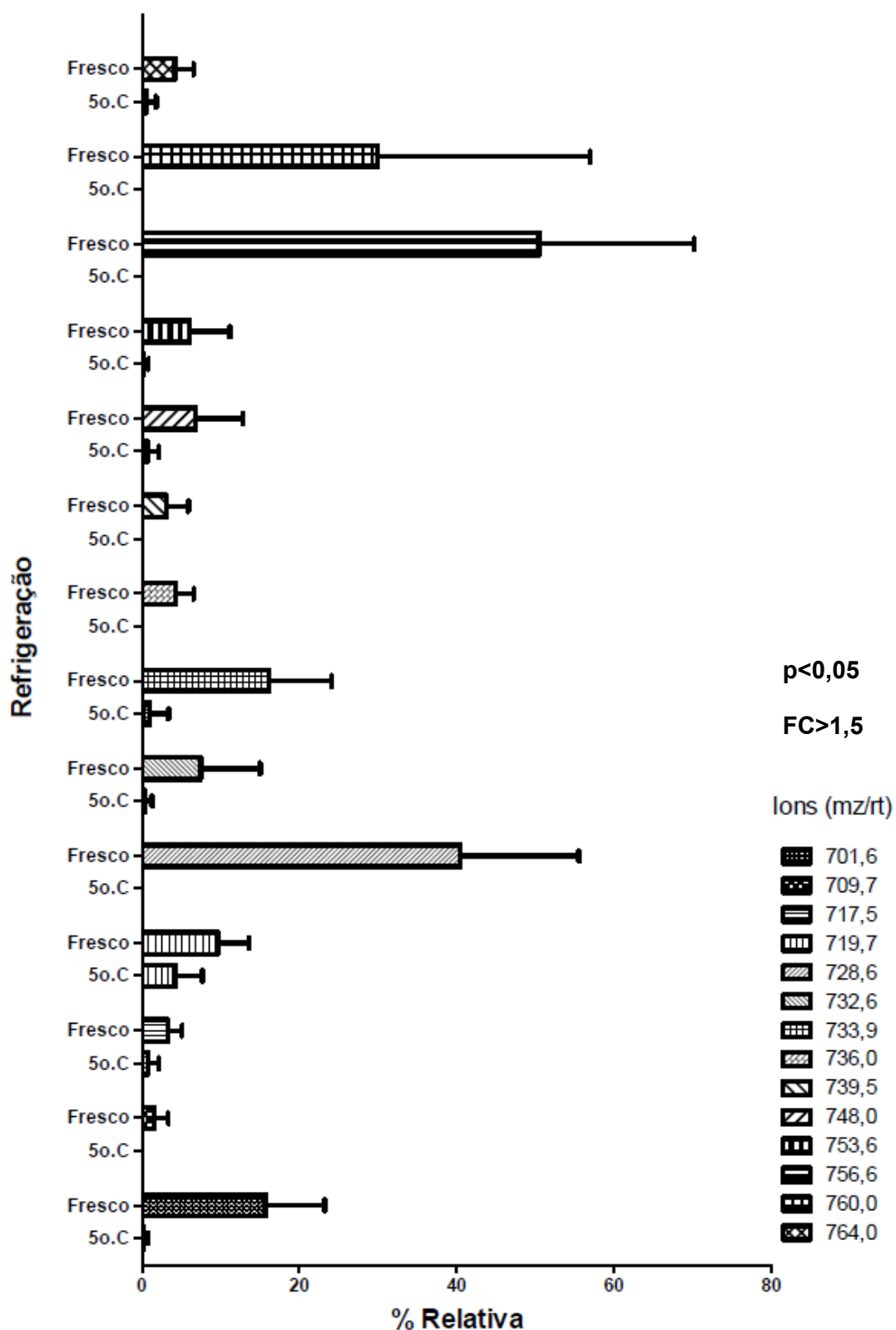


Figura 3a: Representação gráfica dos íons lipídicos de massa carga que apresentaram maior abundância relativa antes da refrigeração a 5°C por 24 horas nos espermatozoides de jumentos.

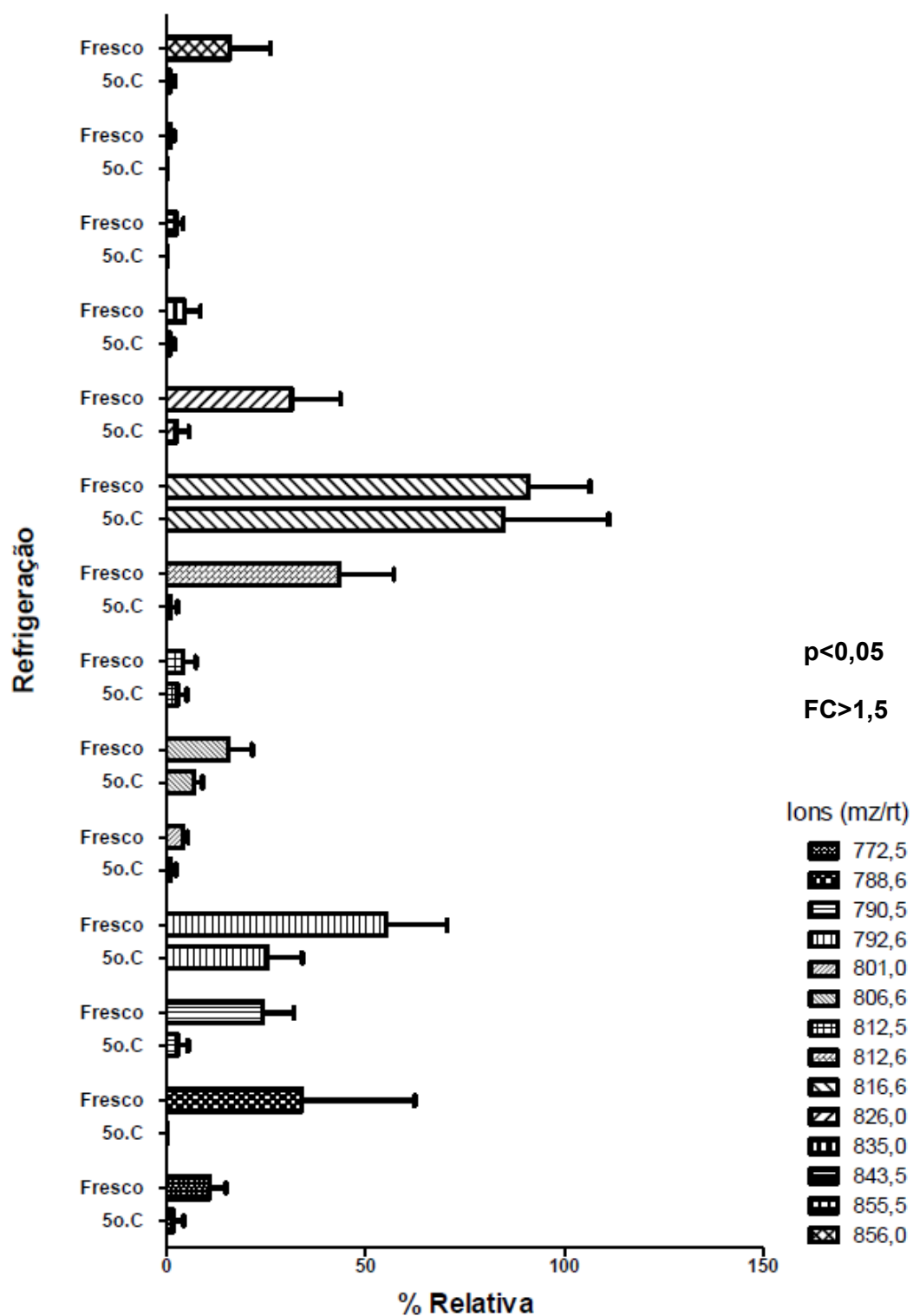


Figura 3b: Representação gráfica dos íons lipídicos de massa carga que apresentaram maior abundância relativa antes da refrigeração a 5°C por 24 horas nos espermatozoides de jumentos.

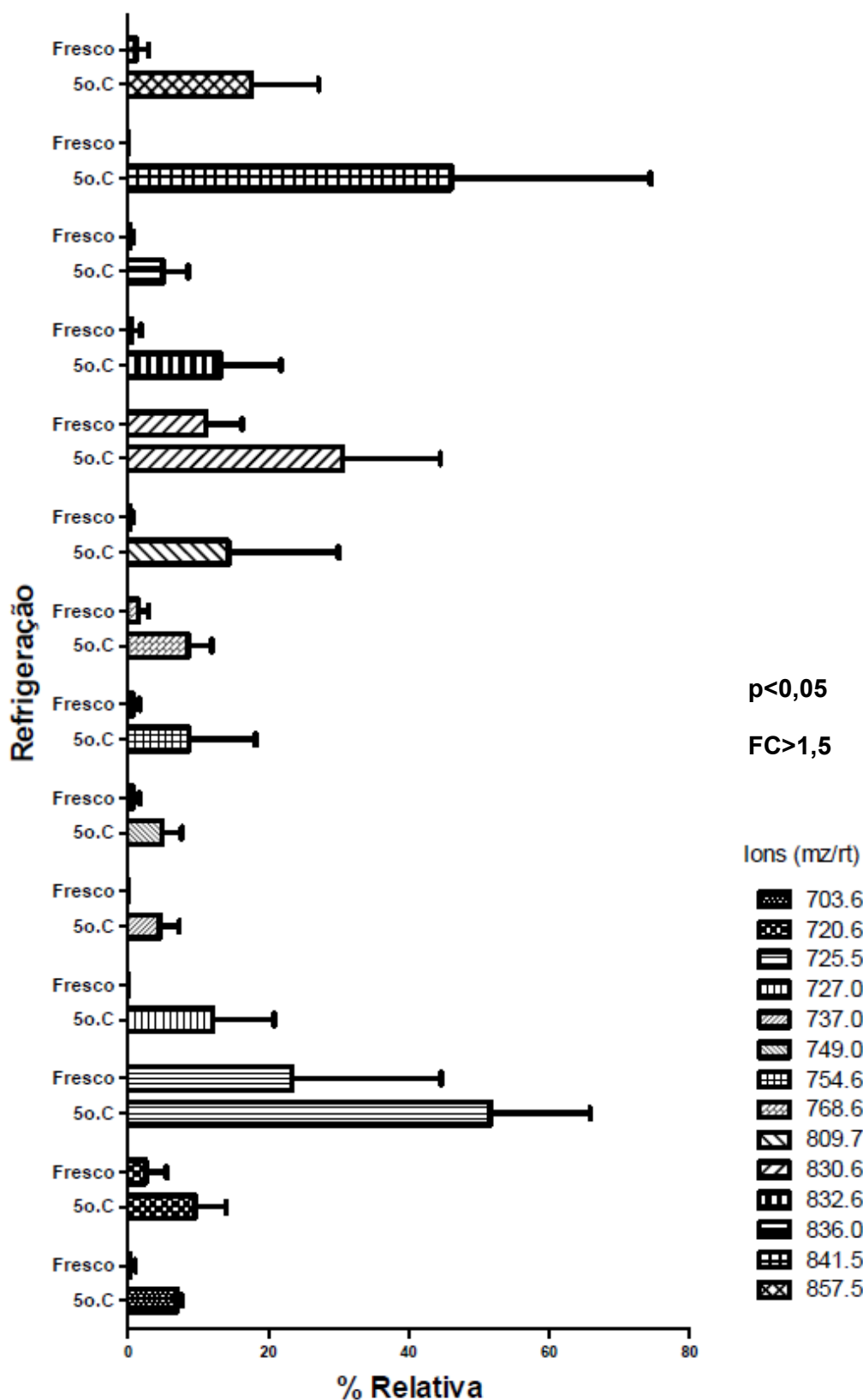


Figura 4: Representação gráfica da diferença na abundância relativa dos íons lipídicos que aumentaram após a refrigeração a 5°C por 24 horas nos espermatozoides de jumentos.

Os principais íons determinados pelas análises de espectrometria de massa estão identificados na Tabela 5. Os fosfolipídeos são classificados com a sigla PC (fosfatidilcolina), SM (esfingomielina), PE (fosfatidiletanolamina), PS (fosfatidilserina), PA (ácido fosfatídico) ou PG (fosfatidilglicerol) seguida pelo número de carbonos e de ligações duplas.

Tabela 5: Valores dos lipídeos de maior abundância relativa em relação a massa-carga (m/z), fórmula molecular (Fosfolipídios), referência bibliográfica da identificação do íon (Referência) de espermatozoides a fresco e refrigerados a 5°C por 24 de jumentos.

Maior abundância Grupos	m/z	Fosfolipídeos (carbonos: insaturações)	Referências
Fresco	706.1	[PC (30:3) + H] ⁺	24
Fresco	709.7	Não identificado	
Fresco	717.5	[PA (36:5) + 2H + Na] ⁺	26
Fresco	719.7	Não identificado	
Fresco	728.6	[PC (32:3) + H] ⁺ , [PEp (36:2) + H] ⁺ , [PEe (36:3) + H] ⁺	24
Fresco	732.6	[PC (32:1) + H] ⁺	24
Fresco	733.9	Não identificado	
Fresco	736	Não identificado	
Fresco	739.5	[PC (34:1) + K] ⁺ with loss of N(CH ₃) ₃	29
Fresco	748	Não identificado	
Fresco	753.6	[SM(18:0)+Na] ⁺	27
Fresco	756.6	[PC (32:0) + Na] ⁺ and/or [PC (34:3) + H] ⁺	23, 24, 27
Fresco	760.6	[PC (32:1) + H] ⁺	23, 24, 27

Fresco	764	Não identificado	
Fresco	772.5	[PCp (36:1) + H] ⁺ , [PCe (36:2) + H] ⁺	24
Fresco	788.6	[PC (36:1) + H] ⁺	23, 24, 26, 27
Fresco	790.5	[PE (38:4) + Na] ⁺	23
Fresco	792.6	[PC (38:6) Alkyl–Acyl + H] ⁺ e/ou [PE (38:6) Alkenyl– Acyl–H+ 2Na] ⁺	31
Fresco	801	Não identificado	
Fresco	806.6	[PC (38:6) + H] ⁺ , [PC(36:3)+ Na] ⁺	23
Fresco	812.5	[PE (38:4) - H +2 Na] ⁺	26
Fresco	812.6	[PC (38:6) + H] ⁺ , [PC(36:3)+ Na] ⁺	23
Fresco	816.6	[PCe (38:5) + Na] ⁺	24
Fresco	826	Não identificado	
Fresco	835	Não identificado	
Fresco	843.5	[SM (26:0) + H] ⁺	27
Fresco	855.5	PPO	31
Fresco	856	Não identificado	
5°C	703.6	[SM (16:0) + H] ⁺	23, 24, 25
5°C	720.6	[PCe (32:0) + H] ⁺	24
5°C	725.5	[SM (16:0) + Na] ⁺	23, 24, 25, 27
5°C	727	Oligomerisation product of DHB matrix	28
5°C	737	Não identificado	
5°C	749	Não identificado	
5°C	754.6	[PC (32:1) + Na] ⁺	27
5°C	768.6	[PE (42:4)+H] ⁺ and/or [PE (36:1)+Na] ⁺	26

5°C	809.7	[SM (22:0) + Na] ⁺	27
5°C	830.6	[PCp (40:0) + H] ⁺ , [PCe (40:1) + H] ⁺ , [PC (38:5) + H] ⁺	23, 24
5°C	832.6	[PC (38:4) + Na] ⁺	25
5°C	836	Não identificado	
5°C	841.5	seminolipid (1-O- palmitoyl-2-O-palmitoyl- 3-β-(3'- sulfogalactosyl)- glicerol	23
5°C	857.5	[PPS (50:0)+H] ⁺	28

PA = ácido fosfatídico, PG = fosfatidilglicerol, PC = fosfatidilcolina; SM = esfingomielina; PE = fosfatidiletanolamina; TAG = triacilglicerol; PCe subspecies = plasmanyl e PCp subspecies = plasmenyl.

Lipidômica sêmen congelado

Os principais íons determinados pelas análises de espectrometria de massa estão identificados na Tabela 6. Antes do processo de congelação o perfil lipídico da membrana dos espermatozoides apresentava 94 diferentes íons e a avaliação após o descongelamento verificou a perda de um desses íons.

Tabela 6: Valores da quantidade total de íons lipídicos, íons exclusivos de cada grupo, íons com maior abundância comuns aos grupos, íons identificados e íons não identificados, encontrados nos espermatozoides de jumentos a fresco e após a descongelação.

	Fresco	Descongelado
Total	94	93
Exclusivos	10	9
Maior abundância entre os comuns	2	2
Íons identificados	0	1
Íons não identificados	0	1

O processo de criopreservação resultou em perda de 10 íons lipídicos de massa carga (m/z) 714.7, 728.0, 753.0, 762.0, 764.0, 851.0, 852.0, 856.0, 881.0 e 883.0. E nove íons que não foram identificados antes do processo estavam presentes na membrana dos espermatozoides após a congelação (m/z) 709.7, 731.0, 778.0, 816.0, 822.0, 843.0, 864.0, 865.0 e 866.0.

A representação de espectros dos fosfolipídeos encontrados na membrana espermática do sêmen fresco e descongelado, obtidos por MALDI-MS, estão representados na Figura 5.

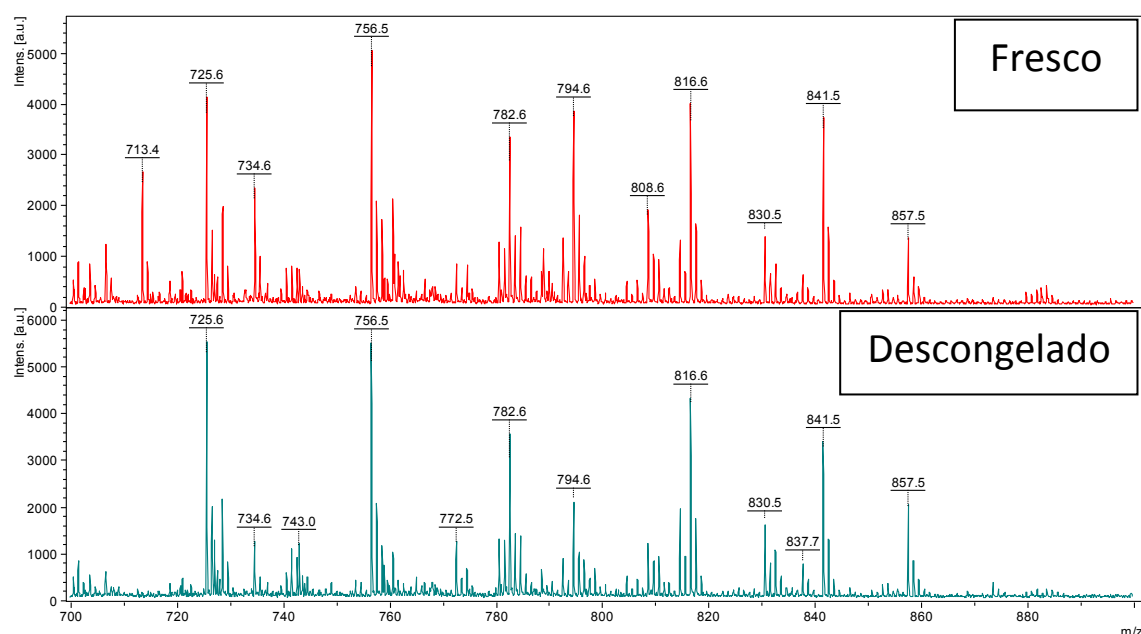


Figura 5: Exemplos representativos de espectros de massas dos perfis de fosfolipídios da membrana espermática do sêmen fresco e descongelado.

A Figura 6 representa a distribuição espacial das amostras que foram submetidas ao processo de criopreservação sobre a composição dos fosfolipídeos da membrana espermática nos momentos antes a após a congelação.

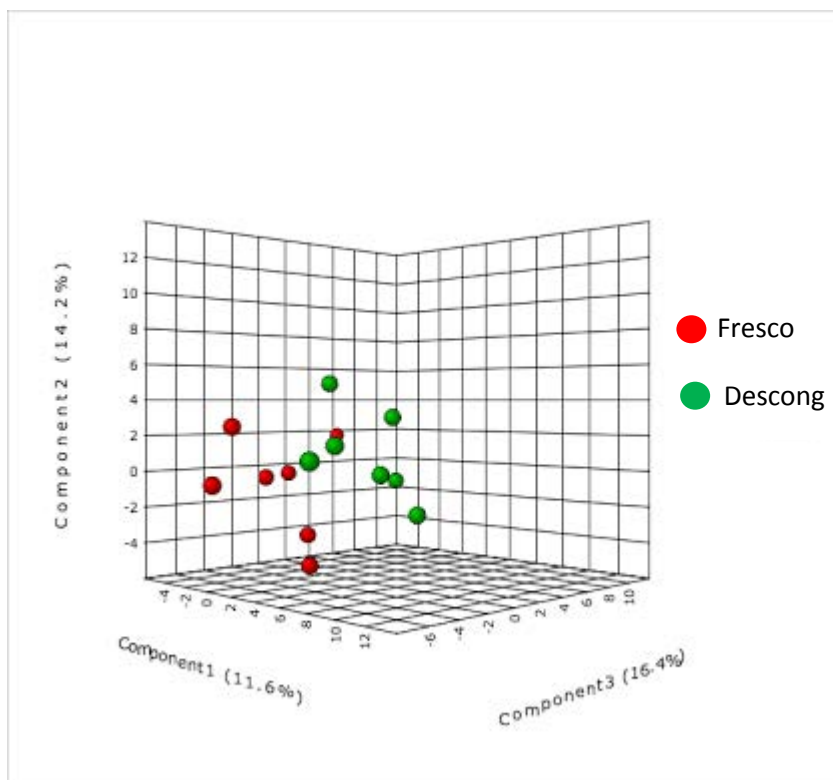


Figura 6: Representação gráfica da diferença do perfil de fosfolipídeos, analisado por PLS-DA, entre os momentos antes e após a congelação do sêmen de jumentos.

Os íons lipídicos que apresentaram maior discrepância entre os momentos avaliados (sêmen fresco e descongelado) foram identificados pela Pontuação VIP (Figura 7). Os íons de m/z 789.1, 837, 747, 732.9, 883, 714.7 e 856 apresentaram maior abundância relativa antes o processo de congelação. E os íons de m/z 724.6, 799, 745, 900, 805.7, 790.7, 700.6 e 797.0 foram diferentes entre os dois grupos ($FC > 1,5$), apresentando maior abundância relativa após o descongelamento ($p < 0,05$).

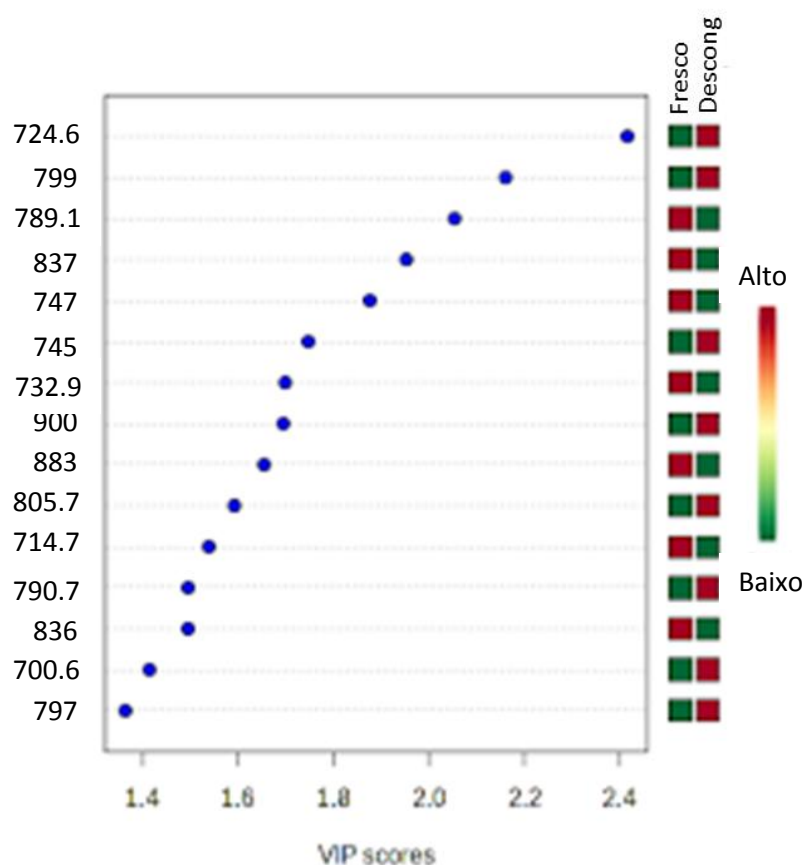


Figura 7: Pontuação VIP identificando os íons lipídicos que apresentaram maior discrepância entre os momentos avaliados sêmen fresco e descongelado de jumentos.

Os íons lipídicos que apresentaram maior abundância relativa ($FC > 1,5$ e $p < 0.05$) antes e após o processo de congelação estão relacionados na figura 8.

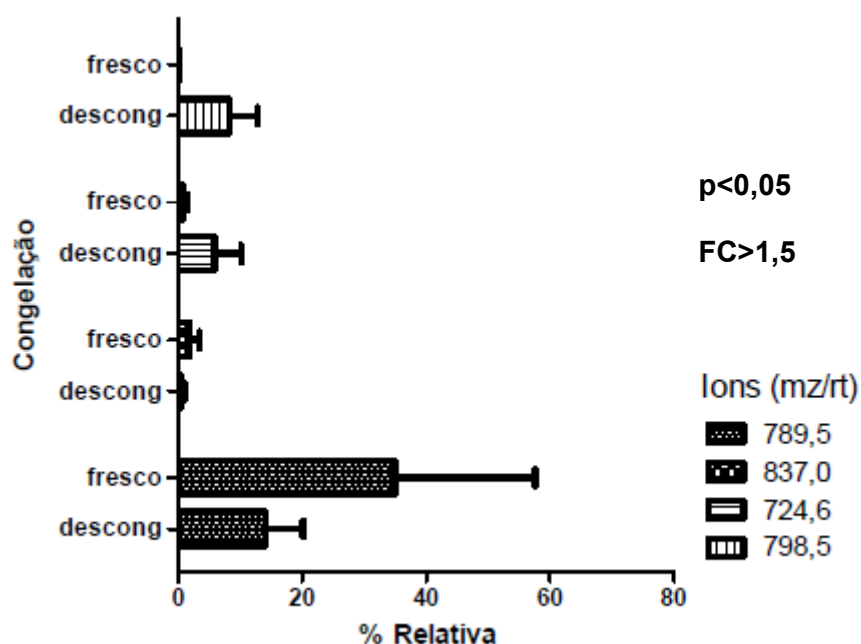


Figura 8: Representação gráfica dos íons lipídicos que apresentaram maior abundância relativa antes e após a congelação do sêmen de jumentos.

Tabela 7: Valores dos lipídeos de maior abundancia relativa em relação a massa-carga (m/z), fórmula molecular (Fosfolipídios), referência bibliográfica da identificação do íon (Referência) de espermatozoides a fresco e após a descongelação do sêmen de jumentos.

Maior abundância Grupos	m/z	Fosfolipídeos (carbonos: insaturações)	Referências
Fresco	789.1	Não identificado	
Fresco	789.5	Não identificado	
Fresco	837	Não identificado	
Fresco	747	Não identificado	
Fresco	732.9	Não identificado	
Fresco	883	Não identificado	
Fresco	714.7	Não identificado	
Fresco	856	Não identificado	
Descong	724.6	Não identificado	
Descong	798.5	[PC (34:1)+K] ⁺	29

Descong	799	Não identificado	
Descong	745	Não identificado	
Descong	900	Não identificado	
Descong	805.7	Não identificado	
Descong	790.7	Não identificado	
Descong	700.6	[PC (30:3) + H] ⁺	26
Descong	797.0	Não identificado	

PA = ácido fosfatídico, PG = fosfatidilglicerol, PC = fosfatidilcolina; SM = esfingomielina; PE = fosfatidiletanolamina; TAG = triacilglicerol; PCe subspecies = plasmanyil e PCp subspecies = plasmenyl.

DISCUSSÃO

Nas últimas décadas houve um grande avanço em relação à criopreservação do sêmen dos jumentos. Novos diluidores, diferentes curvas de refrigeração e congelamento, incorporação de diferentes crioprotetores, antioxidantes, adição ou remoção do plasma seminal, identificação de proteínas presentes em animais good freezer ou good cooler, contribuíram para o incremento das taxas de prenhes para essa espécie [1, 2, 6, 7, 8, 9, 10]. Entretanto, poucos estudos foram direcionados para verificar as alterações lipídicas das membranas espermáticas durante a criopreservação [32, 48].

A manutenção da integridade da membrana espermática é um fator essencial para que os espermatozoides criopreservados mantenham sua viabilidade e seu poder fecundante. Como a composição dessa estrutura é basicamente de composição lipídica o entendimento das modificações ocorridas durante esse processo se tornam essenciais para maiores avanços nessa área [3, 11, 15, 17].

No presente trabalho verificou-se que grandes alterações na lipidômica da membrana espermática contribuíram para uma baixa significativa de todos os parâmetros da cinética espermática após o processo de refrigeração a 5°C e nas amostras descongeladas. Como no presente estudo optou-se pela

utilização de um extensor a base de leite desnatado, largamente utilizado para a espécie equina na refrigeração do sêmen, entretanto essa escolha se mostrou pouco eficiente em relação da preservação do sêmen de jumentos. Possivelmente esse tipo de extensor proteja de forma inadequada os espermatozoides de jumentos durante o processo da refrigeração do sêmen, haja vista que trabalhos que utilizaram diluidores a base de gema de ovo apresentaram valores de motilidade total e progressiva similar as encontradas em sêmen de cavalos após a refrigeração por 24 horas [2, 39].

Assim sendo, a gema de ovo utilizada nesses experimentos pode ter disponibilizados lipídeos essenciais para uma maior manutenção das características espermáticas após a refrigeração, lipídeos esses não encontrados no leite desnatado. Proposta esta reforçada pelos achados de De Leew et al [33], que propõe que lipídeos dos meios diluentes podem aderir à superfície da membrana espermática ou modificar a composição da membrana, ligando-se reversivelmente a superfície da célula promovendo uma barreira física ao dano causado pela criopreservação. [18, 34].

Outro fator que pode ter afetado a viabilidade espermática após a refrigeração seria a peroxidação lipídica da membrana pelas espécies reativas de oxigênio (ROS), pois [40], descreve que a adição de substâncias antioxidantes ao diluidor de contribuiu para uma maior preservação dos espermatozoides de jumentos após a criopreservação a 5°C.

Diferentes fosfolipídeos da membrana dos espermatozoides estão dispostos na face externa da membrana, como a esfingomielina e a fosfatidilcolina, e outros na face interna fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilinositol [44]. Durante o processo de criopreservação podem ocorrer modificações na membrana plasmática que podem levar a perda da viabilidade dos espermatozoides [11]. Durante essas alterações alguns lipídeos que se localizam no folheto interno da bicamada ficam expostos. Essas mudanças podem ser avaliadas através da técnica de espectrometria de massa, através da identificação desses íons lipídeos na superfície externa da membrana do espermatozoide.

Nesse sentido, pode-se explicar os resultados do presente estudo, onde 16 íons lipídicos identificados após o processo de refrigeração a 5°C, não estavam presentes antes da criopreservação.

Através da análise do gráfico de PSL-DA verificou-se a diferença na composição de fosfolipídeos das membranas espermáticas antes e após a refrigeração. De acordo com esses resultados dos 18 íons lipídicos identificados em maior abundância relativa antes do processo de refrigeração, 14 íons eram insaturados. A porção hidrofóbica da estrutura do fosfolipídeo é basicamente composta por ácidos graxos e pode variar em relação ao comprimento e nas proporções ligações duplas (insaturadas) e simples (saturadas). A saturação dos ácidos graxos influencia na capacidade de agregação dos fosfolipídeos afetando a fluidez da membrana plasmática [47]. Membranas mais fluidas possuem maior resistência à criopreservação [54], uma vez que Garcia et al [49] observaram que garanhões com altos níveis de ácidos graxos insaturados apresentaram membranas íntegras após a congelação.

Esta característica é determinada pela percentagem de ácidos graxos insaturados presentes nas moléculas de fosfolipídeos, além do colesterol que modula a estabilidade da membrana [44, 46]. A presença de ligações duplas entre os carbonos nas moléculas de ácidos graxos poliinsaturados faz com que fiquem bastante vulneráveis ao ataque dos radicais livres e a iniciação da cascata de lipoperoxidação [46]. Os radicais livres oxidam os ácidos graxos poliinsaturados através de uma reação autocatalítica e de autopropagação que uma vez iniciada não pode ser parada e que leva a disfunções celulares associadas à perda da integridade de membrana [47]. Além disso, o processo de congelação de sêmen remove as enzimas antioxidantes elevando a produção natural de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Ligações duplas de lipídeos da membrana aumentam a fluidez em ambientes de baixas temperaturas, o que foi confirmado por Sudano et al, [48] que verificaram em embriões bovinos da raça Simental alta concentração de fosfolipídeos insaturados conferindo resistência ao processo de criopreservação. Garcia et al. [49] observaram que em garanhões os ácidos graxos insaturados estão relacionados à maior qualidade da membrana plasmática dos espermatozoides após a congelação. O que pode ser comprovado pelos resultados do presente estudo, onde antes do processo de congelação foi identificado apenas um íon lipídico insaturado (m/z 789.5 [PC 20:5]) o que explica a baixa motilidade total (37%) e progressiva (18%) após o

descongelamento.

O tipo de fosfolípídeos e a quantidade de proteínas presentes na membrana plasmática influenciam na sensibilidade ao choque térmico, sendo que espécies que apresentam maior proporção de os fosfatidilcolina: fosfatidiletanolamina são mais resistentes aos processos de criopreservação [18].

A fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) e esfingomielina (SM) foram os principais fosfolípídeos encontrados na membrana dos espermatozoides de jumentos antes do processo de criopreservação, concordando com os resultados encontrados por Tivilani et al., [50] em espermatozoides humanos. Os mesmos autores verificaram que espermatozoides que apresentavam baixa qualidade apresentavam pequena concentração de PC e PE. Esta queda pode estar relacionada à peroxidação lipídica causada por radicais livres.

Uma variedade de lipídeos da membrana plasmática é perdida durante a criopreservação do espermatozoide, diminuindo a quantidade de constituintes hidrofílicos. Os fosfolípídeos da membrana espermática que mais se perdem durante a criopreservação são a fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina [51], corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

A esfingomielina [703.6 (SM 16:0)] apresentou maior abundância relativa em espermatozoides após o processo de refrigeração, o que pode contribuir para a menor resistência à criopreservação nestes animais, pois a esfingomielina está ligada a maior sensibilidade ao choque frio e a indução de apoptose em oócitos bovinos [52]. A esfingomielina não apresenta dupla ligação, que pode favorecer a maior rigidez da membrana espermática neste grupo de jumentos [14, 53]. Este fato pode explicar o pior desempenho na refrigeração e congelamento de sêmen dos jumentos que possuam maior abundância deste lipídeo [54].

Pouco se sabe sobre o mecanismo de modulação dos lipídeos da membrana do espermatozoide pelas baixas temperaturas. Sob as condições de congelamento é possível que a célula espermática tenha a capacidade de perder principalmente lipídeos hidrofílicos da membrana, tornando a célula hidrofóbica e conseqüentemente resistente a criopreservação [51].

De acordo com Chakrabarty et al [51], um importante mecanismo para

sobrevivência da célula contra condições estressantes parece ser a manipulação da hidrofobia da membrana celular. A característica hidrofóbica das biomembranas talvez seja modulada com adição de lipídeos exógenos específicos, sendo uma nova abordagem para melhorar as técnicas de criopreservação da célula espermática.

Adicionalmente, trabalhos recentes utilizando a incorporação de colesterol à membrana plasmática de espermatozoides equinos, em meio diluente para refrigeração, apresentaram melhora da cinética espermática e integridade de membrana [55, 56]. A mesma ideia pode ser estudada em relação aos íons lipídicos que se perdem durante os processos de criopreservação, possibilitando o aperfeiçoamento dos meios diluentes por incorporação desses lipídeos.

CONCLUSÃO

Os protocolos utilizados para a criopreservação afetaram a composição lipídica da membrana espermática dos espermatozoides de jumentos significativamente, assim como as características de cinética espermática e integridade de membrana. Nesse sentido, novos estudos se fazem necessários para desenvolvimento de metodologias específicas para preservação de espermatozoides de asininos.

REFERÊNCIAS

- [1] Miró, J.; Lobo, V.; Quintero-Moreno, A.; Medrano, A.; Peña, A.; Rigau, T. Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology*. v. 63, p. 1706-1716, 2005.
- [2] Rota, A.; Magalli, C.; Panzani, D.; Camillo, F. Effect of extender, centrifugation and removal of seminal plasma on cooled-preserved Amiatina donkey spermatozoa. *Theriogenology*. v. 69, p. 176-185, 2008.
- [3] Squires, E.L.; Pickett, B.W.; Graham, J.K.; Vanderwall, D.K.; McCue, P.M.; Brummer, J.E. Cooled and Frozen Stallion Semen. *Fort Collins: Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory*, 1999.
- [4] Papa, F.O.; Melo, C.M.; Dell'Aqua, J.A.; Macedo, L.P.; et al. Inovações metodológicas na biotecnologia de refrigeração e congelamento de sêmen equino. *Act. Sci. Vet.*, v.33(Suppl 1), p.19-27, 2005.
- [5] Love, C.C.; Thompson, J.A.; Lowry, V.K.; Varner D.D. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology*, v.57, p.1135-1142, 2002.
- [6] Mello, S.L.V.; Henry, M.; Souza, M.C.; Oliveira, S.M.P. Effect of split ejaculation and seminal extenders on longevity of donkey semen preserved at 5°C. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.52, p.372-378, 2000.
- [7] Cottorello, A.C.P.; Amancio, R.C.; Henry, M.; Borges, I. Effect of storage temperature and extenders on "in vivo" activity of donkey spermatozoa. *Theriogenology*, v.58, p.325-328, 2002.
- [8] Alvarez, A.L.; Serres, C.; Crespo, F.; Santiago, I.; Mateos, E.; Gomez-Cuetara, C. Natural service and artificial insemination with cooled semen of Zamorano-Leones donkey. In: Proceedings of the 15th international congress animal reproduction, v.2, p.393, 2004.
- [9] Oliveira, J.V.; Alvarenga, M.A.; Melo, C.M.; Macedo, L.M.; Dell'Aqua Jr, J.A.; Papa, F.O. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability, In:

Equine Reproduction IX, Evans MJ, Anim Reprod Sci, v.94, p.82-84, 2006.

[10] Rota, A.; Panzani, D.; Sabatini, C.; Camillo, F. Donkey jack (*Equus asinus*) semen cryopreservation: studies of seminal parameters, post breeding inflammatory response, and fertility in donkey jennies. *Theriogenology*, v. 78, p. 1846-1854, 2012.

[11] White, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a Review. *Reprod. Fertil. Dev.* v.5, p. 693-658, 1993.

[12] James, P.S.; Wolf, C.A.; Mackie, A.; Ladha, S.; Prentice, A.; Jones, R. Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Human Reproduction*, v.14, p.1827-1832, 1999.

[13] De Leeuw, F.E.; De Leeuw, A.M.; Den Daas, J.H.G.; Colenbrander, B.; Verkleij, A.J. Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v.30, p.32-44, 1993.

[14] Flesch, F.M.; Gazella, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrana in the process of fertilization *Biochim Biophys Acta*, v.1469, p.197-235, 2000.

[15] Ricker, J.V.; Linfor, J.J; Delfino, W.J.; Kysar, P.; Scholtz, E.L.; Tablin, F.; Crowe, J.H.; Ball, B.A.; Meyers, S.A. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biology of Reproduction*, v.74, p.359-365, 2006.

[16] Parks, J. E.; Ehrenwald, E. Cholesterol efflux from mammalian sperm and its potential role in capacitation. In 'Fertilization in Mammals'. (Eds B. D. Bavister, J. Cummins and E. R. S. Roldan.) p. 155-67, 1990.

[17] GRAHAM, J. K. Principles of cooled semen. In: Equine reproduction, p. 1308, 2010.

- [18] Parks, J. E.; Lynch, D. V. lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*. v.29, p.255-266, 1992.
- [19] Dell'Aqua, J.A.; Papa, F.O.; Alvarenga, M.A.; Zahn, F.S. Effect of centrifugation an packing system on sperm parameters of equine frozen semen. *Anim Reprod Sci*, v.68, p.324-25, 2001.
- [20] Papa, F.O.; Zahn, F.S.; Dell'aqua Jr, J.A.; Alvarenga, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.26, p.184-187, 2002.
- [21] Harrison, R.A.P.; Vickers, S.E. Use of fluorescent probes to access membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fert*, v.88, n.1, p.343-352, 1990.
- [22] Bligh, E. G.; Dyer, J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification, *Biochem. Can. J. Physiol.* v.37, p.911–917, 1959.
- [23] Fuchs, B.; Jakop, U.; Goriz, F.; Hermes, R.; Hildebrandt, T.; Schiller, J.; Muller, K. MALDI-TOF “fingerprint” phospholipid mass spectra allow the differentiation between *ruminantia* and *feloideae* spermatozoa. *Theriogenology*, v. 71, p. 568-575, 2009.
- [24] Milne S. et al. Lipidomics: an analysis of cellular lipids by ESI-MS. *Methods*, v. 39(2), p.92-103, 2006.
- [25] Ferreira, C.R.; Saraiva, S.A.; Catharino, R.R.; Garcia, J.S.; Gozzo, F.C.; Sanvido, G.B.; Santos, L.F.A.; Lo Turco, E.G.; Pontes, J.H.F.; Basso, A.C.; Bertolla, R.P.; Sartori, R.; Guardieiro, M.M.; Perecin, F.; Meirelles, F.V.; Sangalli, J.R.; Eberlin, M.N. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *J Lip Res*, v.51, p.1218-1227, 2010.
- [26] Petkovic, M.; Schiller, J.; Müller, M.; Bernard, S.; Reichl, S.; Arnold; K.; Arnhold, J. 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 Bioch*,

v.289, p.202-206, 2001.

[27] Brugger, B.; Erben, G.; Sandhoff, R.; Wieland, F.T.; Lehmann, W.D. Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA*, v.94, p.2339–2344, 1997.

[28] Schiller, J.; Müller, K.; Süß, R.; Arnhold, J.; Gey, C.; Herrmann, A.; Leßig J.; Arnold, K.; Müller, P. Analysis of the lipid composition of bull spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry—a cautionary note. *Chem Phys Lip*, v.126, p.85–94, 2003.

[29] Hasayaka T, Goto-Inoue N, Sugiura Y, Zaima N, Nakanishi H, Ohishi K, Nakanishi S, Naito T, Taguchi R, Setou M. Matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight (MALDI-QIT-TOF)-based imaging mass spectrometry reveals a layered distribution of phospholipid molecular species in the mouse retina. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.22, p.3415-3426, 2008.

[30] Leßig J., C. Gey, R. Süß, J. Schiller, H.-J. Glander & J. Arnhold: Analysis of the lipid composition of human and boar spermatozoa by MALDI-TOF mass spectrometry, thin layer chromatography and ³¹P NMR spectroscopy. *Comp Biochem Physiol B* 137, 265-277, 2004.

[31] Saraiva SA, Cabral EC, Eberlin MN, Catharino RR. Amazonian vegetable oils and fats: fast typification and TAG profiles by MALDI-TOF Mass Spectrometry Fingerprinting. *Molecules* 2007.

[32] Drokin, S. I.; Vaisberg, T. N.; Kopeika, E. F.; Miteva, K. D.; Pironcheva, G. L. Effect of cryopreservation on lipids and some physiological features of spermatozoa from ram pastured in highlands and in valleys. *Cytobiosis*, v.100, p.27-36, 1999.

[33] De Leeuw, F.E.; Chen, H.C.; Colenbrander, B.; Verkleij, A.J. Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. *Cryobiology*, v.27, p.171-183, 1990.

- [34] Gulaya, N.M.; Margitich, V.M.; Govseeva, N.M.; Klimashevsky, V.M.; Gorpunchenko, I.I.; Boyko, M.I. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. *Arch Androl*, v.46, p.169-175, 2001.
- [35] Miró, J.; Taberner, A.; Rivera, M.; Peña, A.; Medrano, A.; Rigau, T.; Peñalba, A. Effects of dilution and centrifugation on the survival of spermatozoa and the structure of motile sperm cell subpopulations in refrigerated Catalanian donkey semen. *Theriogenology*, v.72, p.1017-1022, 2009.
- [36] Serres, C.; Rodriguez, A.; Alvarez, A.L.; Santiago, I.; Gabriel, J.; Gomez-Cuetara, C.; Mateos, E. Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leones donkey semen. *Theriogenology*, v. 58, p.329-332, 2002.
- [37] Vidament, M.; Vincent, P.; Martin, F.X.; Magistrini, m.; Blesbois, E. Differences in ability of jennies and mares to conceive with cooled and frozen semen containing glycerol or not. *Anim Reprod Sci*, v.112, p.22-35, 2009.
- [38] Dorado, J.; Acha, D.; Ortiz, I.; Galvéz, M. J.; Carrasco, J. J.; Gómez-Arrones, V.; Calero-Carretero, R.; Hidalgo, M. Effect of extender and amino acid supplementation on sperm quality of cooled-preserved Andalusian donkey (*Equus asinus*) spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v. 146, p. 79-88, 2014.
- [39] Funahashi, H.; Sano, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10° C. *Theriogenology*, v.47, p.1605-1616, 2005.
- [40] Bucak, M.N.; Atessahin, A.; Varisli, O.; Yüce, A.; Tekin, N.; Akcay, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology*, v.67, p.1060-1067, 2007.
- [41] Baran, A.; Demir, K.; Sahin, B.E.; Evecen, M.; Bacinoglu, S.; Alkan, S.; Ileri, I.K. Short-term chilled storage of cat semen extended with and without

taurine containing milk extenders. J Anim Vet Adv, v.8, p.1367-1371, 2009.

[42] Ijaz, A.; Ducharme, R. Effect of various extenders and taurine on survival of stallion sperm cooled to 5°C. Theriogenology, v.44, p.1039-1050, 1995.

[43] Siqueira, J.B. relação da fertilidade de sêmen bovino congelado com testes de avaliação espermática, 77f Tese (Medicina Veterinária).Universidade Federal de Viçosa, 2004.

[44] Lehninger, A. L.; Nelson, D. L.; Cox, M.M. *Princípios de Bioquímica*. 2 ed. São Paulo: Savier, p. 838, 2000.

[45] McKee, T.; McKee, J.R. The molecular basis of live. 3 ed. New York. Mc Graw-Hill, p.200-233, 2003.

[46] Bansal, A.K.; Bilaspuri, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen function. Veterinary medicine International, 2010.

[47] Zini, A.; Garrels, K.; Phang, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. Urology, v.55, p.922-926, 2000.

[48] Sudano, M. J.; Santos, V. G.; Tata, A.; Ferreira, C. R.; Paschoal, D. M.; Machado, R.; Buratini, J.; Eberlin, M. N.; Landim-Alvarenga, F.D. Phosphatidylcholine and sphingomyelin profiles vary in Bos taurus indicus and Bos taurus taurus in vitro- and in vivo-produced blastocysts. Biol Reprod, v.87, p.130, 2012.

[49] García, B.M.; Fernandez, L.G.; Ortega-Ferrusola C.; Rodríguez M. A.; Gallardo Bolaños, J.M.; Rodríguez Martinez, H.; Tapia, J.A.; Morcuende, D.; Peña, 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.15, p.811-818, 2011.

[50] Tivalini, H.; Doostib, M.; Nourmohammadic, I.; Mahjubd, H.; Vaisirayganie, A.; Salimif, S.; Hosseinipanahg, S.M. Lipid composition of spermatozoa in normozoospermic and asthenozoospermic males. Prostaglandins Leukotriens and essential Fatty Acid, v.77, p.45-50, 2007.

- [51] Chakrabarty, J.; Banerjeer, D.; Pal, D.; De, J.; Ghosh, A.; Majumder, G.C. Shedding off specific lipid constituents from sperm cell membrane during cryopreservation. *Cryobiology*, v.54, p.27-35, 2007.
- [52] Kalo, D.; Roth, Z. Involvement of the sphingolipid ceramide in heat-shock-induced apoptosis of bovine oocytes. *Reprod Fert Devel*, v.23, p.876-888, 2011.
- [53] Lenci, A.; Picardo, M.; Gandini, L.; Dondero, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Hum Reprod Update*, v.2, p.246-256, 1996.
- [54] Giraud, M.N.; Motta, C.; Boucher, D.; Grizard, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum Reprod*, v.15, p.2160-2164, 2000.
- [55] Combes, G.B.; Varner, D.D; Schroeder, F.; Burghardt, R.C.; Blanchard, T.L. Effect of cholesterol on the motility and plasma membrane integrity of frozen equine spermatozoa after thawing. *J Reprod Fert Suppl*, v. 56, p. 127-32, 2000.
- [56] Hartwig, F.P.; Lisboa, F.P.; Monteiro, G.A.; Maziero, R.R. Freitas-Dell Aqua, C.P.; Alvarenga, M.A.; Papa, F.O.; Dell Aqua, J.A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*, v.15; p.340-346, 2014.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que a composição lipídica da membrana do espermatozoide de jumentos é diferente de cavalos, apresentando maior quantidade de diferentes fosfolipídeos e maior abundância relativa de 18 fosfolipídeos.

Os protocolos utilizados para a criopreservação afetaram a composição lipídica da membrana espermática dos espermatozoides de jumentos significativamente.

ANEXOS

ANEXO I

Preparo das sondas fluorescentes

Soluções	Constituintes	Quantidade
Estoque IP	Iodeto de Propídeo ¹	10 mg
	Solução Fisiológica	20 mg
Estoque CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína ²	9.2 mg
	DMSO	20 mL
Estoque de Formaldeído	Formalina a 40%	1 mL
	Solução fisiológica	79 mL
Estoque de Citrato de Sódio	Citrato de sódio	3g
	Solução fisiológica	100 mL

¹ P4170 – Sigma ² C541 – Sigma

Solução de trabalho

Soluções	Quantidade
Solução de citrato de sódio	96 mL
Solução de formaldeído	10 µL
Solução de iodeto de propídeo	10 µL
Solução de carboxifluoresceína	20 µL

NORMAS REVISTAS:

www.elsevier.com/locate/theriogenology

www.elsevier.com/locate/cryo