

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 23/01/2018.

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

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

TATIANA CABRERA

Botucatu – SP

Janeiro/2017

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

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

TATIANA CABRERA

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

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Ferreira
de Souza

Botucatu – SP
Janeiro/2017

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

Cabrera, Tatiana.

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

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

Orientador: Fabiana Ferreira de Souza

Capes: 50504002

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

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

Nome do autor: Tatiana Cabrera

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

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária FMVZ- UNESP- Botucatu

Prof. Dr. Gabriel Augusto Monteiro

Membro

Departamento de Reprodução Animal

UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Marcio Teoro do Carmo

Membro

Central de Reprodução Lub Breeding

Dra. Camila Paula de Freitas Dell`aqua

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - UNESP- Botucatu

Prof. Dra. Priscilla Nascimento Guasti

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ - UNESP- Botucatu

Data da Defesa: 23 de Janeiro de 2017.

DEDICATÓRIA

À Deus....

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

À minha filha....

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

Ao meu marido....

Pela paciência e companheirismo

À minha mãe Tereza...

Pelo amor incondicional, coragem e força

Aos meus irmãos Júnior e Fernando...

Pelo apoio e carinho

Ao meu tio Cláudio...

Pelas oportunidades na minha carreira profissional

Aos cavalos...

A quem dedico todo o meu aprendizado

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

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

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

LISTA DE ABREVIACÕES

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

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

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

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

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

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

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

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

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

CAPÍTULO 2

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

CAPÍTULO 3

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

RESUMO

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

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

Palavras chave: criopreservação, equino, lipídios, espermatozoide.

ABSTRACT

CABRERA, T. **CORRELATION BETWEEN THE LIPID PROFILE OF THE SEMEN FROM STALLIONS AND POST-THAWING SPERM QUALITY.** Botucatu, 2017 48p, Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

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

Keywords: cryopreservation, equine, lipids, spermatozoa.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 3

CONCLUSÕES GERAIS

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

ANEXOS

Link das normas para submissão à revista Theriogenology

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