

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

**Análise Lipídica De Espermatozoides De Garanhões
Resistentes E Sensíveis A Criopreservação**

DALMYR ROZA RODRIGUES

Botucatu, SP
Fevereiro – 2026

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

ANÁLISE LIPÍDICA DE ESPERMATOZOIDES DE GARANHÕES RESISTENTES E SENSÍVEIS A CRIOPRESERVAÇÃO

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-graduação em Biotecnologia
Animal para obtenção do título de
DOUTOR

Dalmyr Roza Rodrigues
Orientador: Prof. Dr. José Antonio
Dell’Aqua Jr

Botucatu, SP
Fevereiro – 2026

R696a	Rodrigues, Dalmyr Roza Análise Lipídica de Espermatozoides de Garanhões Resistentes e Sensíveis a Criopreservação / Dalmyr Roza Rodrigues. -- Botucatu, 2026 68 p. : il., tabs. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu Orientador: José Antonio Dell'Aqua Jr 1. Biotecnologia animal. 2. Reprodução animal. 3. Lipídio metabolismo. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Dalmyr Roza Rodrigues

ANÁLISE LIPÍDICA DE ESPERMATOZOIDES DE GARANHÕES RESISTENTES E SENSÍVEIS A CRIOPRESERVAÇÃO

BANCA EXAMINADORA

Presidente e orientador: Prof. Dr. Jose Antonio Dell'Aqua Jr

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ- UNESP
Botucatu/SP.

Prof.^a Dr.^a Fabiana Ferreira Souza

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ- UNESP
Botucatu/SP.

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ- UNESP
Botucatu/SP

Prof.^a Dr.^a Priscilla Nascimento Guasti

Botupharma

Prof. Dr. Lucas Emanuel Ferreira Canuto

Centro Universitário das Faculdades Integradas de Ourinhos (UNIFIO)

27 de fevereiro de 2026.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Aparecida (in memoriam) e Luiz (in memoriam), todo esforço enquanto estiveram presentes não foi em vão. Saudades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por tornar possível esta jornada.

A minha esposa e filho, que suportaram e incentivaram esta caminhada.

A todos que direta e indiretamente me apoiaram.

Ao meu orientador José Antonio Dell'Aqua Junior pela colaboração e dedicação, que acreditou e me proporcionou a realização deste projeto.

A Camila Freitas pela paciência e ajuda nas análises e conselhos durante o projeto.

Aos colegas da pós que contribuíram de alguma forma para que este projeto fosse concluído.

A toda a equipe da Unesp em especial da reprodução.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

"This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001”.

*“Quanto mais nos elevamos, menores parecemos aos
olhos daqueles que não sabem voar.”*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

RODRIGUES D.R. **ANÁLISE LIPÍDICA DE ESPERMATOZOIDES DE GANHÕES RESISTENTES E SENSÍVEIS A CRIOPRESERVAÇÃO.** Botucatu – SP. 2026. 68p. Defesa (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O perfil lipídico da membrana espermática está relacionado com a qualidade espermática do sêmen pós-descongelamento. A criopreservação do sêmen é uma das biotécnicas mais utilizadas, mas promove uma diminuição na qualidade espermática pós-descongelamento, e em alguns animais essa diminuição é mais acentuada, sendo estes considerados maus congeladores (*BAD Freezers*). A permeabilidade da membrana espermática é influenciada pela sua composição lipídica. Identificar e entender como o perfil lipídico do espermatozoide interfere na qualidade espermática, e entender suas interações é uma ferramenta importante para melhorar a qualidade do sêmen criopreservado. O presente estudo teve como objetivo analisar e identificar os lipídios do espermatozoide correlacionados a crio-tolerância em ganhões criossensíveis (*BAD Freezer*) e criorresistentes (*GOOD Freezer*). Foram utilizados 16 animais (n=16), sendo: 8 *BAD Freezer* e 8 *GOOD Freezer*. Para obter o perfil lipídico das matrizes amostrais distintas dos espermatozoides purificados, após a remoção do plasma seminal foi realizado MALDI-MS. Os dados gerados foram processados no MetaboAnalyst 6.0 aplicando-se a análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA) para avaliar a separação dos perfis entre os grupos *BAD* e *GOOD*. Os lipídios que apresentaram expressão diferencial foram identificados por meio do teste-*t*, e o gráfico Volcano foi utilizado para comparar os grupos, utilizando os seguintes critérios: valores de $P < 0,05$ e fold-change (FC) ≥ 2 . Para validar a relevância estatística, calculou-se a Importância da Variável na Projeção (VIP) do modelo PLS-DA, assim foram selecionados apenas os lipídios que se apresentaram em comum no gráfico Volcano e VIP, e então realizada a identificação e avaliação do perfil lipídico. O rastreamento lipidômico por MALDI-MS identificou um total de 165 lipídios nos espermatozoides. Desses, 10 mostraram diferenças significativas entre os grupos, 4 em maior abundância nos *BAD* (960.5094 [IPC 38:0;O3], 517.2585 [ST 29:3;O], 924.4688 [PC 39:7 / PE 42:7], e 424.1616 [CAR 10:0]), e 6 apresentaram maior abundância nos *GOOD* (623.3115 [LPI 18:0], 804.4195 [PS 35:6], 873.4483 [PI 34:5], 510.255 [LPC 14:1 / LPE 17:1], 782.4298 [PC O-29:1 / PE O-32:1], 427.2135 [ST 23:4;O6]). Em conclusão, o perfil lipídico apresenta características de separação dos grupos, e possibilita a identificação de biomarcadores associados a criorresistência espermática pós-descongelamento. Foi possível ainda identificar a participação dos lipídios em diversos metabolismos.

Palavra-chave: Criopreservação, Membrana Plasmática, Sêmen, Fosfolipídios, PLS-DA

ABSTRACT

RODRIGUES D.R. lipid analysis of spermatozoa from stallions resistant and sensitive to cryopreservation. Botucatu – SP. 2026. 68p. Defesa (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The lipid profile of the sperm membrane is related to the sperm quality of semen after thawing. Semen cryopreservation is one of the most widely used biotechniques, but it promotes a decrease in post-thawing sperm quality, and in some animals this decrease is more pronounced, these being considered poor freezers (BAD Freezers). The permeability of the sperm membrane is influenced by its lipid composition. Identifying and understanding how the sperm lipid profile interferes with sperm quality, and understanding their interactions, is an important tool to improve the quality of cryopreserved semen. The present study aimed to analyze and identify sperm lipids correlated with cryo-tolerance in cryosensitive (BAD Freezer) and cryoresistant (GOOD Freezer) stallions. Sixteen animals (n=16) were used: 8 BAD Freezer and 8 GOOD Freezer. To obtain the lipid profile of the distinct sample matrices of purified spermatozoa, MALDI-MS was performed after seminal plasma removal. The generated data were processed in MetaboAnalyst 6.0, applying partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) to evaluate the separation of profiles between the BAD and GOOD groups. Lipids showing differential expression were identified using the t-test, and the Volcano plot was used to compare the groups, using the following criteria: P-values <0.05 and fold-change (FC) ≥ 2. To validate statistical relevance, the Importance of the Variable in Projection (VIP) of the PLS-DA model was calculated; thus, only the lipids that were common in the Volcano and VIP plots were selected, and then the identification and evaluation of the lipid profile were performed. Lipidomic screening by MALDI-MS identified a total of 165 lipids in the spermatozoa. Of these, 10 showed significant differences between the groups, 4 with greater abundance in BAD (960.5094 [IPC 38:0;O3], 517.2585 [ST 29:3;O], 924.4688 [PC 39:7 / PE 42:7], and 424.1616 [CAR 10:0]), and 6 showed greater abundance in GOOD (623.3115 [LPI 18:0], 804.4195 [PS 35:6], 873.4483 [PI 34:5], 510.255 [LPC 14:1 / LPE 17:1], 782.4298 [PC O-29:1 / PE O-32:1], 427.2135 [ST 23:4;O6]). In conclusion, the lipid profile shows characteristics that separate the groups and allows the identification of biomarkers associated with post-thaw sperm cryoresistance. It was also possible to identify the participation of lipids in various metabolisms.

Keywords: Cryopreservation, Plasma Membrane, Semen, Phospholipids, PLS-DA

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lipídios identificados que apresentaram diferença entre os grupos..49

Tabela 2. Identificação do metabolismo lipídico.....53

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Percursos lipídicos.....	16
Figura 2. Exemplo de um ácido graxo.....	17
Figura 3. Exemplo de um glicerolípido.....	18
Figura 4. Exemplo de glicerofosfolípido.....	18
Figura 5. Exemplo de um esfingolípido (ceramida).....	19
Figura 6. Estrutura do colesterol com 4 anéis de carbono.....	20
Figura 7. Exemplos de isoprenoides.....	21
Figura 8. Exemplo de sacarolípido.....	22
Figura 9. Exemplo de policetídeos.....	23

CAPÍTULO 2

Figura 1. Fluxograma de processamento das amostras.....	47
Figura 1a: Preparo das amostras.....	47
Figura 1b: Extração dos lipídios.....	47
Figura 1c: MALDI-MS e análise estatística.....	47
Figura 2. Diagrama de Venn.....	50
Figura 3. Gráfico de vulcano.....	50
Figura 4a. Análise de componentes principais (PCA).....	51
Figura 4b. Agrupamento mostrado como dendrograma hierárquico.....	51
Figura 5. Agrupamento mostrado como mapa de calor.....	52
Figura 6. Diagrama de cordas.....	53

LISTA DE SIGLAS

ANOVA = análise de variância

Cer = Ceramida

FA = Ácidos graxos

GL = Glicerolipídios

GP = Glicerofosfolipídios

GSL = Glicosfingolipídio

LPO = Peroxidação Lipídica

MP = Motilidade Progressiva

PA = Ácido fosfatídico

PBS = Solução Salina Tamponada com Fosfato

PC - Fosfatidilcolina

PCA = Análise de Componentes Principais

PE = Fosfatidiletanolamina

PI = Fosfatidilinositol

PLS-DA = Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais

PR = Lipídios prenol

PS = Fosfatidilserina

PUFAs = Ácidos graxos poli-insaturados

ROS = Espécies Reativas de Oxigênio

SGG = Sulfagalactosilglicerol

SM = Esfingomielina

SP = Esfingolipídio

ST = Lipídios de Esteróis

VLCPUFA – Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia muito longa

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	xiii
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Lipídios	15
2.2 Membrana espermática	23
2.4 Criopreservação do sêmen	26
2.5 Garanhões Criorresistentes vs. Criosensíveis.....	27
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
4. HIPÓTESE E OBJETIVO.....	28
4.1 Hipótese	28
4.2 Objetivo Geral.....	29
REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO 2.....	40
ARTIGO	41
1 INTRODUÇÃO.....	43
2 MATERIAIS E MÉTODOS	44
2.1 Animais e design experimental	44
2.2 Coleta e Preparo das Amostras	45
2.3 Lipidômica	45
2.4 Análise Estatística	48
2.5 Análise Lipídica	48
3 RESULTADOS	49
3.1 Lipidômica dos espermatozoides.....	49
4 DISCUSSÃO.....	54
5 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS	60

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A criopreservação de sêmen é uma das biotecnologias mais utilizadas, possibilitando o máximo aproveitamento do material genético de animais de alto valor zootécnico, mantendo este material seguro e viável por tempo indeterminado. Por outro lado, esta biotécnica só tem seu valor com altas taxas de prenhez quando se utiliza o sêmen criopreservado (ZHANG *et al.*, 2023). A criopreservação tem como consequência uma diminuição da qualidade espermática pós-descongelação em razão de diversos fatores, como por exemplo, injúrias na membrana e alterações na estrutura lipídica da membrana levando a alteração da permeabilidade da bicamada lipídica (CSERMAK JR *et al.*, 2018; SICHERLE *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2021).

As injúrias na membrana plasmática, além de promoverem a diminuição da motilidade, afetam a viabilidade e integridade do DNA do espermatozoide (OZIMIC *et al.*, 2023), a integridade da membrana plasmática está diretamente ligada as taxas de fertilização do oócito, pois, também interfere na capacitação espermática, reação acrossomal e pôr fim, na fertilização (AITKEN, 1994). A fertilização do oócito ocorre após o espermatozoide sofrer transformações bioquímicas e funcionais em sua membrana plasmática que alteram o efluxo de colesterol, influxo de cálcio através de canais iônicos da membrana espermática, promovendo a hiperativação espermática (HERNANDEZ-SILVA *et al.*, 2020).

A membrana celular é organizada estruturalmente por proteínas e lipídios e acreditava-se que apenas uma pequena porção dos lipídios da membrana interagiam com as proteínas (SINGER e NICOLSON, 1972). Os lipídios da membrana espermática desempenham funções biofísicas e regulatórias determinantes para a competência fertilizante, transcendendo a estruturação passiva da bicamada. A elevada concentração de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) promove a fluidez necessária para a fusão com o oócito, a reorganização das *lipid rafts* promovida pela interação com proteínas atuam como plataformas de ancoragem para canais iônicos e receptores de superfície (WALTERS *et al.*, 2020).

Os lipídios que compõe a membrana espermática além de atuar como molécula de sinalização e reserva energética, podem ser indicadores químicos (OZIMIC *et al.*, 2023). Indicador químico é qualquer substância que forneça um sinal visível (BRITANNICA, 2021). Qualquer característica ou parâmetro biológico capaz de ser mensurado, avaliado e classificado como um indicador de qualquer processo biológico é considerado um biomarcador (STRIMBU e TAVEL, 2010; ZAMORA-OBANDO *et al.*, 2022).

Este projeto visa analisar os lipídios de espermatozoides de garanhões criorresistentes e criosensíveis, e tentar compreender os fatores relacionados a criorresistência. Os resultados obtidos têm o potencial de otimizar a seleção de reprodutores, refinar os protocolos de congelação e, conseqüentemente, aumentar a eficiência reprodutiva da inseminação artificial em equinos no uso de sêmen criopreservado.

O presente estudo busca identificar e correlacionar o perfil lipídico do sêmen de garanhões bons e maus congeladores, proporcionando assim um melhor entendimento do mecanismo de ação lipídico e futuramente proporcionar a melhora na qualidade espermática do sêmen criopreservado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lipídios

Os lipídios constituem um grupo heterogêneo de biomoléculas orgânicas caracterizadas, primariamente, por sua insolubilidade em água e alta solubilidade em solventes apolares, como clorofórmio e éter. Diferente das proteínas e ácidos nucleicos, os lipídios não são definidos por um grupo funcional químico comum, mas sim por suas propriedades físicas decorrentes da presença de cadeias de hidrocarbonetos hidrofóbicas. Estruturalmente, muitos lipídios de relevância biológica, como os fosfolipídios de membrana, apresentam anfipaticidade, possuindo uma região polar (hidrofílica) e outra apolar (hidrofóbica). Essa dualidade estrutural é fundamental para a auto-organização em bicamadas e micelas em meio aquoso, constituindo a base arquitetônica das

membranas celulares e das reservas energéticas em organismos vivos (NELSON e COX, 2014).

A classificação científica dos lipídios, é realizada baseada na química estrutural e na biossíntese, estabelecida pelo consórcio internacional *LIPID MAPS*[®]. Segundo este sistema, os lipídios são classificados em oito classes principais, derivadas de dois precursores fundamentais: o grupo cetoacil e o grupo isopreno (Figura1). As classes são definidas como: (1) ácidos graxos, (2) glicerolipídios, (3) glicerofosfolipídios, (4) esfingolipídios, (5) lipídios de esteróis, (6) lipídios prenóis, (7) sacarolipídios e (8) policetídeos, sendo derivados do grupo cetoacil as classes 1, 2, 3, 4, 7, 8 e do grupo isopreno as classes 5 e 6. Esta padronização permitiu avanços nos estudos de lipidômica, facilitando a compreensão das vias metabólicas e das funções sinalizadoras destas moléculas (FAHY *et al.*, 2009).

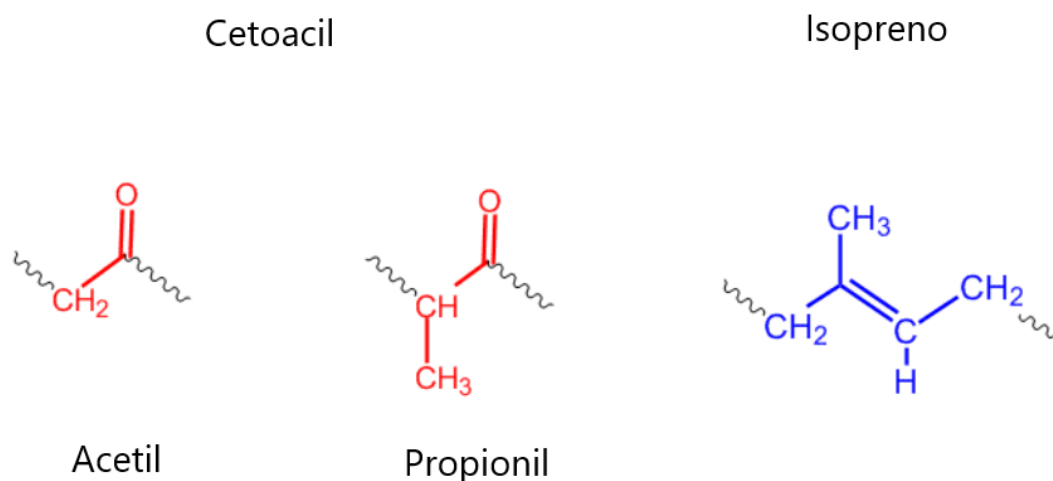


Figura 1: Precursores lipídicos. Fonte: Adaptado de *LipidMaps* (2025)

Os ácidos graxos (FA) são considerados os blocos de construção fundamentais para a formação de lipídios complexos, sendo sintetizados por meio do alongamento da cadeia a partir de um *primer* de acetil-CoA e grupos malonil-CoA (FAHY *et al.*, 2005; EVANS *et al.*, 2021). São ácidos monocarboxílicos de cadeias longas que podem ser saturados, monoinsaturados ou polinsaturados (MOTTA, 2011; EVANS *et al.*, 2021; SHAN *et al.*, 2021). De

acordo com o sistema de classificação *LIPD MAPS*[®] (2025) os ácidos graxos possuem 9 subclasses. Os ácidos graxos são precursores de diversas moléculas classificadas como subprodutos ou derivados de ácidos graxos, como: álcoois, aldeídos, ésteres (como monoésteres de cera e acilcarnitinas) e amidas graxas, como as *N*-acil etanolaminas (FAHY *et al.*, 2005). Os PUFA's são particularmente vitais para a fluidez da membrana (MOTTA, 2011; LENZI *et al.*, 1996). Segundo Walters *et al.*, (2020) embora essas longas cadeias insaturadas proporcionem a fluidez necessária para a fusão dos gametas, elas são o “ponto fraco” da célula, isto é, as duplas ligações são os alvos primários das Espécies Reativas de Oxigênio (ROS), desencadeando a cascata de Peroxidação Lipídica (LPO) que leva à produção de aldeídos citotóxicos e morte celular.

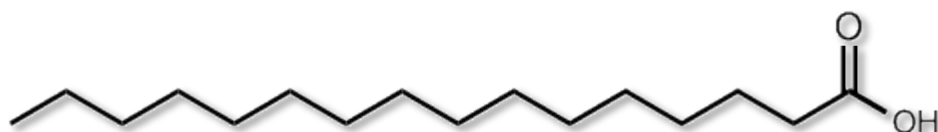


Figura 2: Exemplo de um ácido graxo. Fonte: *LipiMaps* (2025)

Os glicerolipídios (GL) incluem todos os lipídios que contêm glicerol na sua estrutura (FAHY *et al.*, 2005), de acordo com número de grupos de hidroxila ligado ao glicerol denominamos monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis, ou mono-, di- e triglicerídeos (MOTTA, 2005). Os triacilgliceróis (TAGs) são a forma mais abundante e a principal reserva de energia em animais e plantas, (MOTTA, 2011; MEER *et al.*, 2008; EVANS *et al.*, 2021). Os diacilgliceróis (DAGs), que são moléculas de sinalização importantes (EVANS *et al.*, 2021), são encontradas na membrana espermática, e os glicoglicerolipídios, como o seminolipídio (Sulfogalactosilglicerolipídio - SGG) é um lipídio encontrado exclusivamente na membrana espermática (SUHAIMAN e BELMONTE, 2024), e encontra-se localizado no folheto externo da membrana plasmática (SERAFINI e O'FLAHERTY, 2025).

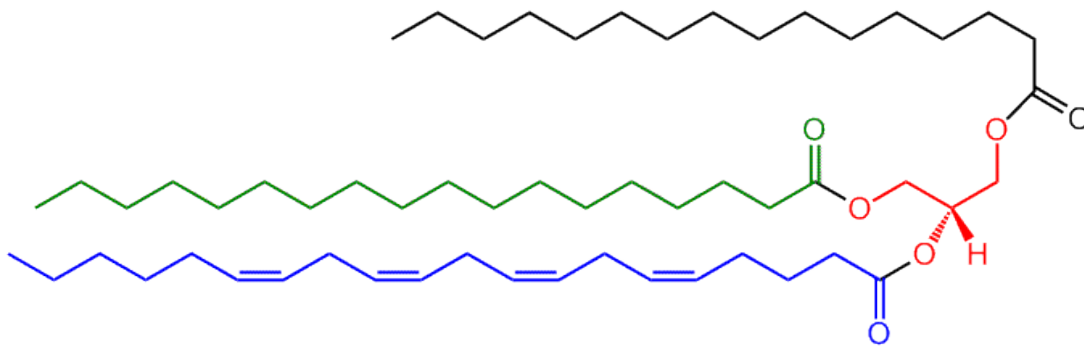


Figura 3: Exemplo de um glicerolípido, em preto um ácido graxo, em vermelho a molécula de glicerol, em verde ácido palmítico, e em azul ácido araquidônico. Fonte: *LipidMaps* (2025)

Os glicerofosfolípídios (GP), frequentemente chamados de fosfolípídios, são os componentes estruturais primários da bicamada lipídica das células eucarióticas (MOTTA, 2011; EVANS *et al.*, 2021). Eles têm dois ácidos graxos de cadeia longa de forma estrutural nas posições C1 e C2 e um grupo fosfato na posição C3 (SERAFINI e O'FLAHERTY, 2025), são tipicamente ricos em PUFA de cadeia longa (C20-C22) (ORESTI *et al.*, 2025). As subclasses incluem a fosfatidilcolina (PC), que é o GP mais comum (SUAREZ-TRUJILLO *et al.*, 2021; SERAFINI e O'FLAHERTY, 2025), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) e ácido fosfatídico (PA) (MOTTA, 2011; SERAFINI e O'FLAHERTY, 2025). Os GPs também funcionam como segundos mensageiros e incluem as cardiolipinas (CL) e os plasmalogênios (FAHY *et al.*, 2005). A PC e a PE são lipídios dominantes na membrana plasmática (SUAREZ-TRUJILLO *et al.*, 2021).

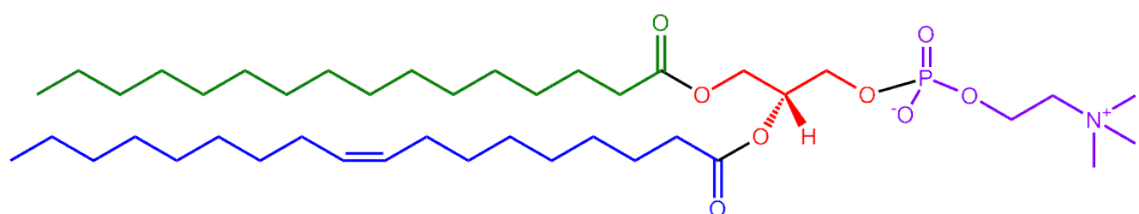


Figura 4: Exemplo de glicerofosfolípido. Ao centro em vermelho a molécula de glicerol, em verde um ácido palmítico, em azul um ácido oleico, e em roxo uma fosfatidilcolina. Fonte: *LipidMaps* (2025).

Os esfingolípídios (SP) formam uma família complexa com um esqueleto central de base esfingóide, derivada da condensação de um aminoácido (geralmente serina) e um ácido graxo (geralmente palmitato) (FAHY, 2005; SABOURDY *et al.*, 2008; AIROLA e HANNUN, 2013). As subclasses principais são as ceramidas, os fosfoesfingolípídios (como a esfingomielina - SM) e os glicosfingolípídios (GSLs) (FAHY *et al.*, 2005; MOTTA, 2011). A ceramida (Cer) é a molécula central (N-acilada) precursora de todos os outros esfingolípídios (MOTTA, 2011; WANG *et al.*, 2023). SM e Cer estão intimamente ligados ao colesterol na formação dos microdomínios de membrana (*lipid rafts*), que são cruciais para a sinalização celular e a estrutura da membrana (SERAFINI e O'FLAHERTY, 2025). Metabolitos esfingolipídicos bioativos, como Cer, esfingosina e esfingosina-1-Fosfato, são importantes segundos mensageiros que regulam a apoptose, proliferação e secreção (WANG *et al.*, 2023). Em espermatozoides, a SM e a Cer são notáveis por incorporarem ácidos graxos poli-insaturados de cadeia muito longa (VLCPUFA, C26), sendo mais abundantes na SM do que na Cer (FURLAND *et al.*, 2007; SUHAIMAN e BELMONTE, 2024; ORESTI *et al.*, 2025). Durante a capacitação, ocorre uma redistribuição lateral dessas moléculas, permitindo que receptores de reconhecimento da zona pelúcida se aglomerem na região apical, um pré-requisito obrigatório para a fertilização (SUHAIMAN e BELMONTE, 2024).



Figura 5: Exemplo de um esfingolípido (ceramida). Base esfingóide em verde e vermelho (cabeça polar), esfingosina em verde é uma cadeia longa de 18 carbonos, em azul um ácido palmítico. Fonte: *LipidMaps* (2025).

Os lipídios esteróis (ST) representados majoritariamente pelo colesterol em animais, funcionam como moduladores da rigidez da membrana. Na biologia espermática, o colesterol exerce um efeito estabilizador que previne a fusão

prematura do acrossoma (SERAFINI e O'FLAHERTY, 2025). Os esteroides, que também contêm a mesma estrutura central de quatro anéis fundidos (Figura 6), têm diferentes funções biológicas como hormônios e moléculas de sinalização (LIPIDMAPS, 2024). O colesterol é o mais importante e amplamente estudado em mamíferos, sendo uma molécula anfipática essencial para a estrutura da membrana (FAHY *et al.*, 2005; MOTTA, 2011; SEZGIN *et al.*, 2017), o colesterol regula a fluidez e a estabilidade da membrana, e sua presença nas *lipid rafts* (balsas lipídicas), são importantes para a função celular e a capacitação espermática (SERAFINI e O'FLAHERTY, 2025). Os esteróis também atuam como precursores dos esteroides (hormônios como testosterona e estradiol) e da vitamina D (MOTTA, 2011; WANG *et al.*, 2023). Outras subclasses incluem ésteres de colesterol, fitosteróis, esteróis fúngicos e ácidos biliares (FAHY *et al.*, 2005; LIEBISCH *et al.*, 2020). O mecanismo central da capacitação espermática envolve o efluxo de colesterol da membrana em direção a aceptores proteicos (como a albumina) no trato reprodutivo feminino (TRAVIS e KOPF, 2002). Esse efluxo desorganiza as *lipid rafts* e aumenta a permeabilidade ao cálcio, ativando a reação acrossômica (SERAFINI e O'FLAHERTY, 2025).

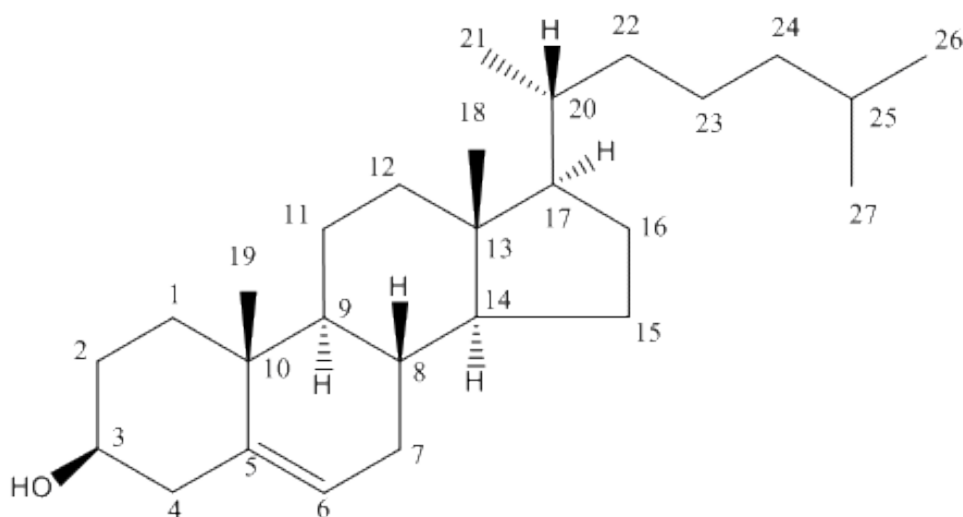


Figura 6: Estrutura do colesterol com 4 anéis de carbono, 3 com 6 carbonos e 1 com 5 carbonos. Fonte: *LipidMaps* (2025).

Os lipídios prenol (PR), são biossintetizados através do isopreno (hidrocarboneto insaturados). Incluem compostos vitais como vitaminas K e E,

atuando como agentes antioxidantes, evitando a oxidação da membrana celular e diminuindo a produção de radicais livres (EVANS *et al.*, 2021).

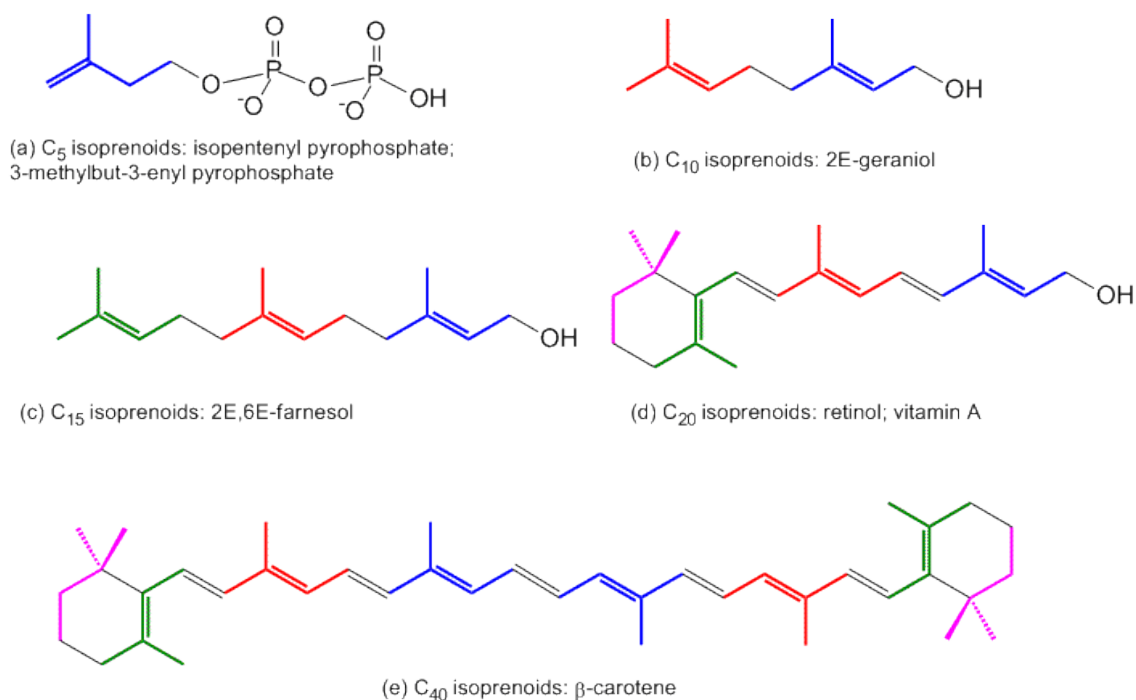


Figura 7: Exemplos de isoprenoides. (a) isopentenil pirofosfato, (b) 2E-geraniol, (c) 2E,6E-farnesol, (d) Retinol (Vitamina A), (e) β-caroteno. Fonte: *LipidsMaps* (2025).

Os sacarolipídios (SL) são definidos como lipídios onde ácidos graxos estão ligados diretamente a um esqueleto de açúcar (FAHY *et al.*, 2005; FAHY *et al.*, 2009; EVANS *et al.*, 2021), formando estruturas compatíveis com a bicamada da membrana (FAHY *et al.*, 2005).

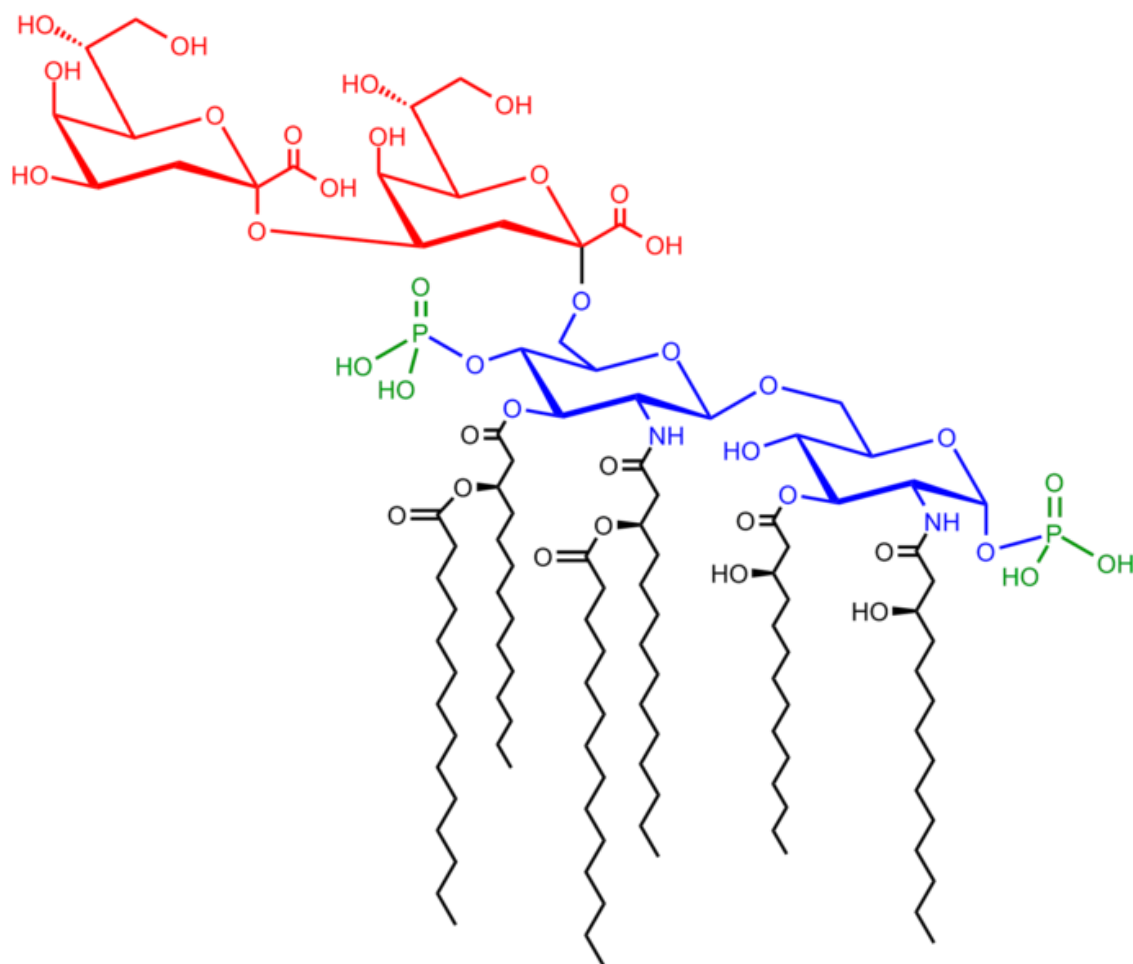


Figura 8: Exemplo de Sacarolipídio. Ácido 3-desoxi-D-mano-oct-2-ulosônico (Kdo) - Lipídio A. Resíduos de glucosamina em azul, resíduos de Kdo em vermelho, cadeias de ácido graxos em preto e grupos fosfato em verde. Fonte: *LipidMaps* (2025).

Os policetídeos (PK) formam um grupo diversificado de metabólitos secundários produzidos pela polimerização de subunidades de acetil e propionil, por enzimas que se assemelham às sintases de ácidos graxos (FAHY *et al.*, 2005).

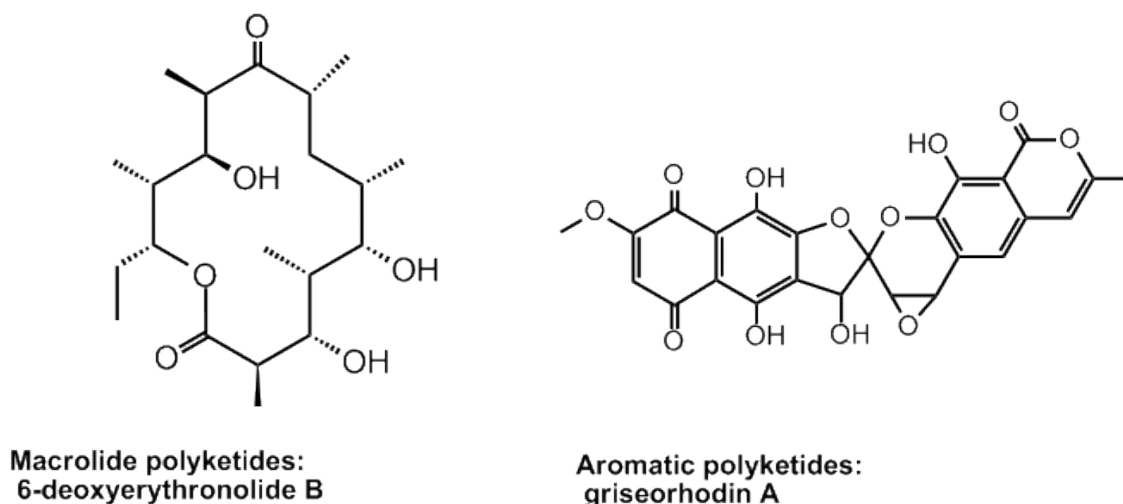


Figura 9: Exemplo de policetídeos. A esquerda policetídeos macrolídeos, a direita policetídeos aromáticos. Fonte: *LipidMaps* (2025).

Os lipídios da membrana apresentam três funções principais. Primeiro atuam como reservatório de energia principalmente como ésteres de triacilglicerol e ésteres de esterois essenciais para biogênese da membrana. Em segundo por terem uma bicamada de fosfolipídios, esses lipídios são polares, isto é, são hidrofílicos e hidrofóbicos exercendo a capacidade de segregação dos componentes internos da célula. E por fim funcionam como primeiros e segundos mensageiros em processos de sinalização e reconhecimento molecular (MEER *et al.*, 2008).

Na membrana plasmática as *lipids rafts* proporcionam um ambiente lipídico particularmente ordenado, que estão envolvidas na transdução de sinal e no tráfego intracelular (TSUI-PIERCHALA *et al.*, 2002), além disso, as *lipids rafts* são essenciais para a reação acrossomal e fertilização do oócito (WOOD *et al.*, 2016).

2.2 Membrana espermática

A membrana plasmática (MP) é uma estrutura crucial que circunda todas as células vivas, atuando como uma barreira especializada que separa o meio intracelular do meio extracelular, e é essencial para a compartimentalização celular (CHEN *et al.*, 2021; STIEGER *et al.*, 2021), ela é uma interface dinâmica de transdução de sinais e intercâmbio de substâncias

(MEER *et al.*, 2008; BORGES *et al.*, 2011). Estruturalmente o modelo amplamente aceito da MP é o mosaico fluido (SINGER e NICOLSON, 1972; BORGES *et al.*, 2011; MOTTA, 2011). As membranas plasmáticas das células animais contêm 4 fosfolipídios principais: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e esfingomielina (COOPER, 2000), seminolipídio, fosfatidilglicerol e fosfatidilinositol (GADELLA *et al.*, 2001), além de proteínas, glicoproteínas e glicolipídios (MOTTA, 2011).

A membrana espermática segue os modelos básicos de membranas biológicas, com uma bicamada de fosfolipídios com proteínas associadas (BORGES *et al.*, 2011). A bicamada lipídica é composta, por aproximadamente 70% de fosfolipídios, 25% de lipídios neutros e 5% de glicolipídios (MANN e MANN, 1981), os fosfolipídios apresentam-se em maior abundância na membrana espermática (MANN e MANN, 1981; BORGES *et al.*, 2011; CABRERA, 2017) e são fonte de substrato para respiração endógena dos espermatozoides (BORGES *et al.*, 2011), porém, a proporção desta composição e o tipo desses componentes variam drasticamente conforme a função e o tipo celular (MOTTA, 2011), a composição lipídica espermática difere da cabeça e da cauda dos espermatozoides, por exemplo, a membrana mitocondrial interna é rica em proteínas devido à sua alta atividade metabólica, enquanto a membrana plasmática espermática é particularmente rica em lipídios para permitir as modificações fisiológicas necessárias à fertilização (SHAN *et al.*, 2021).

A composição lipídica dos espermatozoides é extremamente complexa, a combinação de lipídios na membrana difere daquelas encontradas nas membranas plasmáticas das células somáticas (PARKS e LYNCH, 1992), e alguns lipídios estão presentes apenas no sêmen e em nenhum outro tecido ou fluido corporal (WOOD *et al.*, 2016). Esta complexidade está relacionada com a motilidade espermática, capacitação espermática, reação acrossomal e penetração do oócito (GAUTIER e AURICH, 2022).

A estrutura lipoproteica é especializada e passa por uma série de modificações bioquímicas e biofísicas essenciais para a fertilização. Após a espermatogênese, o espermatozoide é liberado do testículo essencialmente inerte (FRANÇA e AVELLAR, 2025), com o acrossomo formado a partir do complexo de Golgi e o genoma paterno condensado pela substituição de histonas por protaminas (MORETTI *et al.*, 2023). As modificações lipídicas

ocorrem de forma dinâmica e contínua, iniciando-se na espermatogênese com a síntese de SGG (TANPHAICHITR *et al.*, 2018), e o surgimento de esfingolipídios ricos em VLCPUFA no estágio de espermátócito (WANG *et al.*, 2023).

Durante a maturação epididimária, o espermatozoide adquire motilidade e potencial fertilizante (FRANÇA e AVELLAR, 2025), o que é acompanhado por uma por uma reorganização bioquímica crucial mediada por trocas lipídicas com epididimossomos, resultando em um aumento na proporção de PUFA, como o ácido docosa-hexaenoico (DHA) (GAUTIER e AURICH, 2022), e em uma redução de aproximadamente 50% nos níveis de colesterol, o que diminui a razão colesterol/fosfolipídio e aumenta a fluidez da bicamada (CINKARA *et al.*, 2025).

A capacitação espermática, inicia-se no trato reprodutivo feminino, e envolve o desprendimento de proteínas e o efluxo de colesterol da membrana, facilitado por aceptores como a albumina no fluido ovidutal. O efluxo de colesterol leva a um aumento na fluidez da membrana, reorganização das *lipid rafts* e influxo de cálcio, ativando vias de sinalização (cAMP/PKA) que resultam em fosforilação de proteínas tirosina e no padrão de motilidade hiperativada, essenciais para a penetração do oócito (XUE *et al.*, 2025).

As *lipids rafts* ou balsas lipídicas são microdomínios de membrana ordenados por líquidos, enriquecidos com esfingolipídios, colesterol, glicoesfingolipídios e contém um glicolipídio não esfingolipídio, o fosfatidilglicosídeo (NAGATSUKA e HIRABAYASHI, 2008), elas atuam na transdução de sinais e sofrem alterações em sua composição durante a criopreservação alterando a qualidade espermática pós-descongelção, o comprometimento das *lipids rafts* em decorrência de danos sofridos podem interferir na sinalização proteica transmembrana (BAI *et al.*, 2019).

A ligação aos glicoconjugados da zona pelúcida (ZP) desencadeia a reação acrossomal (RA) (FLESCH e GADELLA, 2000), um evento de exocitose regulado que envolve a fusão da membrana plasmática apical com a membrana acrossomal externa, liberando enzimas hidrolíticas para penetrar a ZP, e culminando na fusão do espermatozoide com a membrana plasmática do oócito (BUSTANI e BAIEE, 2021), durante o processo de RA ocorre a interação entre proteínas e o metabolismo lipídico podendo esta interação estar associada com a disfunção acrossomal (HERNÁNDEZ-ÁVILÉS *et al.*, 2024), os lipídios

permitem que algumas proteínas se agreguem a membrana e outras se dispersem (MEER *et al.*, 2008).

Na ejaculação o espermatozoide entra em contato com o plasma seminal que confere proteínas decapacitantes e esteróis, que se ligam à membrana para mantê-la estabilizada e inibir a capacitação prematura (HERNANDEZ-SILVA *et al.*, 2020). As interações entre o plasma seminal e os lipídios da membrana plasmática espermática são fundamentais para a regulação da estabilidade, motilidade e competência fertilizante da célula (GUASTI *et al.*, 2012).

2.4 Criopreservação do sêmen

A criopreservação do sêmen de ganhões é um processo que, embora fundamental para a disseminação de genética superior, impõe estresses severos à estrutura espermática, resultando em uma redução significativa da longevidade celular e da taxa de fertilização quando comparada ao uso de sêmen fresco ou refrigerado (AL-KASS e MORRELL, 2024). A composição da membrana espermática é alterada durante o processo de criopreservação alterando sua homeostase (HEZAVEHEI *et al.*, 2021), a mudança da permeabilidade da membrana interfere nas funções celulares, como a capacitação espermática e a reação acrossomal (SIEME *et al.*, 2015).

Durante as etapas de resfriamento e congelamento, os espermatozoides sofrem injúrias decorrentes do choque térmico, desequilíbrio osmótico e formação de cristais de gelo, que podem provocar a ruptura física da membrana plasmática e a desestabilização da sua assimetria bilipídica (ALI *et al.*, 2024). Além dos danos estruturais, ocorre uma redução drástica no potencial de membrana mitocondrial e na síntese de ATP, acompanhada por um aumento expressivo na produção de ROS, o que desencadeia a LPO das membranas e a fragmentação do DNA (CARNEIRO *et al.*, 2018). O processo também induz alterações moleculares na membrana espermática conhecidas como criocapacitação, caracterizadas pelo efluxo prematuro de colesterol e pela translocação de fosfatidilserina (GARCIA-OLIVEROS *et al.*, 2025), eventos que mimetizam a capacitação fisiológica, promovendo o consumo prematuro de energia reduzindo o potencial fertilizante do espermatozoide (BAÑAS *et al.*, 2023).

A preservação da membrana espermática durante a criopreservação do sêmen é fator primordial para qualidade seminal pós-descongelação (GAUTIER e AURICH, 2022).

Observa-se, contudo, uma acentuada variabilidade individual na criotolerância, permitindo a classificação dos garanhões em "bons" ou "maus" congeladores de acordo com a capacidade de suas células em manter a motilidade progressiva e a integridade de membrana após a descongelação (CABRERA *et al.*, 2018; AL-KASS e MORRELL, 2024).

2.5 Garanhões Criorresistentes vs. Criossensíveis

A qualidade espermática do sêmen de garanhões pode variar entre indivíduos, e entre sêmen fresco, refrigerado e criopreservado (BUBENÍŤKOVÁ *et al.*, 2020).

A classificação de garanhões em "bons congeladores" (*GOOD Freezers*) ou "maus congeladores" (*BAD Freezers*) fundamenta-se na acentuada variabilidade individual da resistência espermática ao processo de criopreservação, devido ao fato de que a seleção genética equina prioriza o desempenho atlético e não a capacidade de fertilização (BUBENÍŤKOVÁ *et al.*, 2020; CASTRO *et al.*, 2025). Os garanhões são classificados como *GOOD freezers* quando apresentam motilidade total pós-descongelação superior a 30% ou 35%, ao passo que os *BAD freezers* exibem valores inferiores a esses limiares, frequentemente associados a uma baixa integridade da membrana plasmática (AURICH *et al.*, 2020; BUBENÍŤKOVÁ *et al.*, 2020). Carneiro *et al.* (2018) classificaram os garanhões utilizando como métrica um declínio da motilidade espermática em relação ao sêmen fresco, definindo bons congeladores como aqueles com redução de 25% e maus congeladores com diminuição de 40%.

Do ponto de vista molecular e da cinemática, os bons congeladores possuem subpopulações espermáticas mais rápidas e lineares (BUBENÍŤKOVÁ *et al.*, 2020), além de maior atividade mitocondrial e uma abundância superior de fosfatidilcolinas que estabilizam a membrana (CABRERA *et al.*, 2018). Estudos apontam que existe diferenças no perfil fosfolipídico da membrana espermática

entre raças de garanhões, como mangalarga marchador e quarto de milha (RAMIRES NETO, 2015). Essa diferença no perfil lipídico pode contribuir para as variações na resistência da membrana ao processo de criopreservação (CABRERA, 2017). Foi observada que a diferença no perfil lipídico de garanhões *GOOD* e *BAD* pode estar relacionada com os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa interferindo na criorresistência (RAMIRES NETO *et al.*, 2025).

O sucesso na fertilização do oócito pelo espermatozoide criopreservado depende da preservação de alguns atributos indispensáveis, como, metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva, enzimas acrossomais, e integridade da membrana plasmática (CHIRINEA *et al.*, 2013).

Zhang *et al.*, (2024) avaliaram proteínas e metabólitos associados a motilidade espermática como candidatos a biomarcadores, demonstrando que a utilização de biomarcadores associados a motilidade espermática pode ser uma alternativa para identificar problemas reprodutivos relacionados ao espermatozoide.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a necessidade e demanda do uso de biotécnicas aplicadas a preservação do material genético da espécie equina, tanto para reserva genética e para a manutenção de animais de alto valor zootécnico, necessitamos também avançar com as biotecnologias da reprodução, minimizando a diminuição da qualidade espermática quando o sêmen é submetido ao processo de criopreservação. E para isso devemos entender a composição lipídica da membrana espermática e seu mecanismo de ação para melhorar os índices reprodutivos quando se trata do uso de material genético criopreservado.

4. HIPÓTESE E OBJETIVO

4.1 Hipótese

A composição lipídica da membrana espermática em garanhões criorresistentes difere daquela em garanhões criossensíveis, e essas diferenças lipídicas são responsáveis pela maior tolerância ao processo de criopreservação.

4.2 Objetivo Geral

Avaliar e comparar o perfil lipídico do espermatozoide em garanhões, a fim de compreender o mecanismo lipídico e correlacioná-lo com a criorresistência ou criossensibilidade do espermatozoide.

REFERÊNCIAS

- AIROLA MV e HANNUN YA. Sphingolipid metabolism and neutral Sphingomyelinases. **Handb Exp Pharmacol**. 2013 ; (215): 57–76.
doi:10.1007/978-3-7091-1368-4_3
- AITKEN RJ. A Free Radical Theory of Male Infertility. **Reprod. Fertil. Dev.**, 1994, 6, 19-24
- AL-KASS, Z.; MORRELL, J.M. Freezing Stallion Semen—What Do We Need to Focus on for the Future? **Veterinary Science**, v.11, 65, 2024.
<https://doi.org/10.3390/vetsci11020065>
- AL SMADI MA, HAIDAR H, SALAS-HUETOS A, FISCHER U, ABDUL-KHALIQ H, MEESE E, ABU-HALIMA M. Small RNA sequencing in individually selected sperm: Biomarkers for male subfertility and predictors of pregnancy success. **Non-coding RNA Research**, v.16, p.126-143, 2026.
- ALI KH, YAHYA YI, ALMAJIDI YQ, AL-MUSAWI MH, HAJIPOUR H, SEYYED MORADIAN A, GHORBANI M, MOGHADAM FM. Protective effects of canthaxanthin-loaded seminal exosomes on the quality of human spermatozoa during cryopreservation. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.96, 2024, 105696
- ALMADALY EA, FARRAG FA, SAADELDIN IM, EL-MAGD MA, EL-RAZEK IMA. Relationship between total protein concentration of seminal plasma and sperm characteristics of highly fertile, fertile and subfertile Barkiram semen collected by electroejaculation. **Small Ruminant Research** 144 (2016) 90–99.
- AM-IN N., R.N. KIRKWOOD, M. TECHAKUMPHU, W. TANTASUPARUK. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. **Theriogenology**, v.75, p.897-903, 2011
- AURICH J, KUHLE J, TICHY A, AURICH C. Efficiency of Semen Cryopreservation in Stallions. **Animals** 2020, 10, 1033;
doi:10.3390/ani10061033

BAI C., KANG N, ZHAO J, DAI J, GAO H, CHEN Y, DONG H, HUANG C, DONG Q. Cryopreservation disrupts lipid rafts and heat shock proteins in yellow catfish sperm, **Cryobiology**, v.87, p.32-39, 2019

BAÑAS, Š, BENKO, F.; D'URAC'KA, M.; LUKÁČ, N.; TVRDÁ, E. Epicatechin Prevents Cryocapacitation of Bovine Spermatozoa through Antioxidant Activity and Stabilization of Transmembrane Ion Channels. **Int. J. Mol. Sci.** 2023, 24, 2510. <https://doi.org/10.3390/ijms24032510>

BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING GROUP.. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. **Clin Pharmacol Ther.** 2001 Mar;69(3):89-95. doi: 10.1067/mcp.2001.113989. PMID: 11240971.

BODU M, HITIT M, MEMILI E. Harnessing the value of fertility biomarkers in bull sperm for buck sperm. **Animal Reproduction Science**, v.272, 107643, 2025

BORGES J.C., SILVA M.R., GUIMARÃES J.D., ESPER C.R., FRANCESCHINI P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.3, p.303-314, jul./set. 2011.

BRITANNICA EDITORS. "chemical indicator". **Encyclopedia Britannica**, 6 Apr. 2021, <https://www.britannica.com/science/chemical-indicator>. Accessed 9 December 2025.

BUBENÍČKOVÁ F., ŠICHTAŘ J., NOVÁČKOVÁ L., SIROHI J., ŠIMONÍK O. The structure of subpopulations of stallion spermatozoa after thawing differs between *GOOD* and poor freezers. **Czech Journal Animal Science**, v.65, p.403–410, 2020

BUSTANI GS, BAIEE FH. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders, **Veterinary World**, 14(5): 1220-1233. 2021

CABALLERO-CAMPO P, LIRA-ALBARRÁN S, AMARAL A, HONG C, SHAH N, CARLES A, LI D, BARRERA D, HERNÁNDEZ-SILVA G, RAMALHO-SANTOS J, WANG T, HIRST M, LARREA F, COSTELLO J, RINAUDO P, CHIRINOS M. Integrative Molecular and Functional Analysis of Human Sperm Subpopulations

to Identify New Biomarkers of Fertilization Potential. **Archives of Medical Research**, v.56, n.5, 103210, 2025

CABRERA, TATIANA. **Correlação Entre O Perfil Lipídico Do Sêmen De Garanhões E A Qualidade Espermática Pós- Descongelção**. 2017. 64f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP Botucatu, 2017

CABRERA T, RAMIRES-NETO C, BELAZ KRA, FREITAS-DELL'AQUA CP, ZAMPIERI D, TATA A, EBERLIN MN, ALVARENGA MA, SOUZA FF. Influence of spermatozoal lipidomic profile on the cryoresistance of frozen spermatozoa from stallions. **Theriogenology**, 108 (2018) 161e166.

CARNEIRO JAM, CANISSO IF, R.S. BANDEIRA, V.F.C. SCHEEREN, CAMILA P. FREITAS-DELL'AQUA, MARCO A. ALVARENGA, FREDERICO O. PAPA, JOSE A. DELL'AQUA. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having *GOOD* or *BAD* semen freezing ability. **Animal Reproduction Science**, v.192, p.107-118, 2018

CASTRO, M.; LEAL, K.; PEZO, F.; CONTRERAS, M.J. Sperm Membrane: Molecular Implications and Strategies for Cryopreservation in Productive Species. **Animals** 2025, 15, 1808. <https://doi.org/10.3390/ani15121808>

CHEN S, WANG M, LI L, WANG J, MA X, ZHANG H, CAI Y, KANG B, HUANG J, LI B. High-coverage targeted lipidomics revealed dramatic lipid compositional changes in asthenozoospermic spermatozoa and inverse correlation of ganglioside GM3 with sperm motility. **Reproductive Biology and Endocrinology** (2021) 19:105<https://doi.org/10.1186/s12958-021-00792-3>

CHIRINEA V.H.; SICHERLE C.C.; LOPES M.D. Congelamento de sêmen e sua eficiência na inseminação de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.164-168, Abr/Jun 2013

CINKARA SD, BADILLI N, GÜNGÖR IG, CIHANGIROĞLU AÇ, ACISU TC, ÖZMEN GK, ARKALI G, ŞEYMA ÖZER KAYA, MUSTAFA SÖNMEZ, SEYFETTİN GÜR, ABDURRAUF YÜCE, ÖKKEŞ YILMAZ, TÜRK G. Morpho-functional and biochemical improvements in ram spermatozoa following

intraepididymal platelet-rich plasma administration. **Reproductive Biology**, v.25, n.3, 2025, 101045, <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2025.101045>.

COOPER GM. **The Cell: A Molecular Approach**. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9839/>

CSERMAK JR. A.C., PAULA T.A., COSTA E.P., GUIMARÃES J.D., FERREIRA L.B.C, ARAUJO G.R., DECO-SOUZA T., GARAY R.M. Use of combination of fluorescent probes to identify sperm subpopulations for quality assessment of fresh and cryopreserved canine semen. Preliminary results. **Journal of Veterinary Andrology**, v.3, n.1, p.19-25, January/June 2018.

DING N, ZHANG Y, WANG J, LIU J, ZHANG J, ZHANG C, ZHOU L, CAO J, JIANG L. Lipidomic and transcriptomic characteristics of boar seminal plasma extracellular vesicles associated with sperm motility. **BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids** 1870 (2025) 159561

EVANS HC, DINH TTN, HARDCASTLE ML, GILMORE AA, UGUR MR, HITIT M, JOUSAN FD, NICODEMUS MC AND MEMILI E (2021) Advancing Semen Evaluation Using Lipidomics. **Frontiers in Veterinary Science**. 8:601794. doi: 10.3389/fvets.2021.601794

FAHY, E., S. SUBRAMANIAM, H. A. BROWN, C. K. GLASS, A. H. MERRILL, JR., R. C. MURPHY, C. R. H. RAETZ, D. W. RUSSELL, Y. SEYAMA, W. SHAW, T. SHIMIZU, F. SPENER, G. VAN MEER, M. S. VANNIEUWENHZE, S. H. WHITE, J. L. WITZTUM, AND E. A. DENNIS. A comprehensive classification system for lipids. **J. Lipid Res**.2005. 46: 839–861.

FAHY E, SUBRAMANIAM S, MURPHY RC, NISHIJIMA M, RAETZ CRH, SHIMIZU T, SPENER F, MEER GV, WAKELAM MJO, DENNIS EA. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. **J. Lipid Res**. 2009. 50: S9–S14

FLESCH FM, GADELLA BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta** 1469 (2000) 197-235

FRANÇA LR, AVELLAR MCW. Espermatogênese e maturação espermática: aspectos relevantes durante o exame andrológico nas espécies domésticas. **Rev Bras Reprod Anim**, v.49, n.2 p.574-584, abr./jun. 2025

FURLAND NE, ORESTI GM, ANTOLLINI SS, VENTURINO A, MALDONADO EN, AVELDAÑO MI. Very Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids Are the Major Acyl Groups of Sphingomyelins and Ceramides in the Head of Mammalian Spermatozoa. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 282, n. 25, p. 18151–18161, June 22, 2007

GADELLA BM, RATHI R, M. M. BEVERS, J. F. H. M. BROUWERS, D. NEILD, B. COLENBRANDER. The Role Of Lipid Dynamics In Equine Sperm Plasma Membrane Function. **Proceedings Of The Second Meeting Of The European Gamete Group** (EEGG), 2001

GARCIA-OLIVEROS LN, BOZZI AR, SILVA TOC, NASCIMENTO FB, DE OLIVEIRA TR, MIGUEL EL, ALVES MBR, RANGEL RB, DE ANDRADE AFC, DE ARRUDA RP, KERNS K, CELEGHINI ECC. Phosphatidylserine translocation, cholesterol spatial distribution, and acrosome reaction reliably distinguish sperm capacitation from cryoinjury in bovine sperm. **Cryobiology**, v.121, 105302, 2025

GAUTIER C & AURICH C. “Fine feathers make fine birds” – The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, n.246, 2022.

GUASTI PN, MONTEIRO GA, PAPA FO. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozóides equinos. **Vet. e Zootec**. 2012 jun.; 19(2): 169-180

HERNÁNDEZ-AVILÉS, C., RAMÍREZ-AGÁMEZ, L., WEINTRAUB, S.T. Proteomic analysis of sperm from fertile stallions and subfertile stallions due to impaired acrosomal exocytosis. **Science Reports**, v.14, 12446, 2024 <https://doi.org/10.1038/s41598-024-63410-3>

HERNANDEZ-SILVA G, LOPEZ-ARAIZA JEF, LOPEZ-TORRES AS, LARREA F, TORRES-FLORES V, CHIRINOS M. Proteomic characterization of human

sperm plasma membrane-associated proteins and their role in capacitation. **Andrology**, v.8, p.171-180, 2020.

HEZAVEHEI M, SHARAFI M, FATHI R, SHAHVERDI A, GILANI MAS. Membrane lipid replacement with nano-micelles in human sperm cryopreservation improves post-thaw function and acrosome protein integrity. **Reproductive BioMedicine Online**, v.43, n.2, p.257-268, 2021.

KIM E., ALMUBARAK A., TALHA N., YU I., JEON Y. The Use of κ -Carrageenan in Egg Yolk Free Extender Improves the Efficiency of Canine Semen **Cryopreservation**. *Animals*, v.12, n.1, 2021. 88. <https://doi.org/10.3390/ani12010088>

LENZI 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. **Human Reproduction Update**, v.2, n.3, p.246-256, 1996.

LIEBISCH G , FAHY E, AOKI J, DENNIS EA, DURAND T, EJSING CS, FEDOROVA M, FEUSSNER I, GRIFFITHS WJ, KÖFELER H, MERRILL, JR. AH, MURPHY RC, O'DONNELL VB, OSKOLKOVA O, SUBRAMANIAM S, WAKELAM MJO, SPENER F. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. **J. Lipid Res.** (2020) 61(12) 1539–1555 DOI:/10.1194/jlr.S120001025

LIPID MAPS®, <https://www.lipidmaps.org/>

MANJUNATH P, THÉRIEN I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, 53 (2002) 109–119

MANN T e MANN CL. Male Reproductive Function and semen, Themes and Trends in Physiology. **Biochemistry and Investigative Andrology**. 1ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1981

MEER GV, VOELKER DR, FEIGENSON GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol.** v.9, n.2, p.112–124, 2008. doi:10.1038/nrm2330

MEMILI E, MOURA AA, KAYA A. Metabolomes of sperm and seminal plasma associated with bull fertility. **Animal Reproduction Science**, v.220, 106355, 2020

MORETTI, E.; SIGNORINI, C.; CORSARO, R.; GIAMALIDI, M.; COLLODEL, G. Human Sperm as an In Vitro Model to Assess the Efficacy of Antioxidant Supplements during Sperm Handling: A Narrative Review. **Antioxidants** 2023, 12, 1098. <https://doi.org/10.3390/antiox12051098>

MOTTA VT. **Bioquímica Básica**. AutoLab. 2005

MOULA AB, EL AMIRI B. Factors influencing seminal plasma composition and its relevance to succeed sperm technology in sheep: An updated review. **Small Ruminant Research**, v.215, 106759, 2022.

NAGATSUKA Y, HIRABAYASHI Y. Phosphatidylglucoside: A new marker for lipid rafts. **Biochimica et Biophysica Acta** 1780 (2008) 405–409

NELSON D.L. & COX M.M. **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 6ed. Artmed. 2014

ORESTI, G.M.; LUQUEZ, J.M.; BELMONTE, S.A. Lipid Signature of Motile Human Sperm: Characterization of Sphingomyelin, Ceramide, and Phospholipids with a Focus on Very Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids. **Int. J. Mol. Sci.** 2025, 26, 9301. <https://doi.org/10.3390/ijms26199301>

OZIMIC, S.; BAN-FRANGEZ, H.; STIMPFEL, M. Sperm Cryopreservation Today: Approaches, Efficiency, and Pitfalls. **Current Issues in Molecular Biology**, v.45, p.4716–4734, 2023.

PARKS JE E LYNCH DV. Lipid Composition and Thermotropic Phase Behavior of Boar, Bull, Stallion, and Rooster Sperm Membranes. **Cryobiology**, v.29, p.255-266, 1992.

RAMIRES-NETO C. **Perfil lipídico da membrana plasmática e alterações morfofuncionais de espermatozoides de garanhões resistentes e sensíveis à criopreservação**. 2015. 150f. Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”. 2015

RAMIRES NETO C, FREITAS-DELL'AQUA C.P., SANCLER-SILVA Y.F.R., K.R. BELAZ, D. ZAMPIERI, A. TATA, M. EBERLIN, F.O. PAPA, J.A. DELL'AQUA, M.A. ALVARENGA. Lipid profile differences in semen from “*BAD*” and “*GOOD*” freezer stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.145, 105315, 2025.

ROCA J, RODRIGUEZ-MARTINEZ H, PADILLA L, LUCAS X, BARRANCO I. Extracellular vesicles in seminal fluid and effects on male reproduction. An overview in farm animals and pets. **Animal Reproduction Science** 246 (2022) 106853

SABOURDY F, KEDJOUAR B, SORLI SC, COLIÉ S, MILHAS D, SALMA Y, LEVADE T. Functions of sphingolipid metabolism in mammals — Lessons from genetic defects. **Biochimica et Biophysica Acta** 1781 (2008) 145–183

SERAFINI S, O'FLAHERTY C. Novel insights into the lipid signalling in human spermatozoa. **Human Reproduction - Developments in reproductive biology and medicine**, v.40, n.8, p.1440–1451, 2025

SEZGIN E, LEVENTAL I, MAYOR, EGGELING C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. **Molecular cell biology**, v.18 | JUNE 2017

SHAN, S., XU, F., HIRSCHFELD, M., BREINIG, B. Sperm Lipid Markers of Male Fertility in Mammals. **Int. J. Mol. Sci.** 2021, 22, 8767. <https://doi.org/10.3390/ijms22168767>

SICHERLE C.C, SOUZA F.F, FREITAS-DELLAQUA C.P., MOTHÉ G.B., PADOVANI C.R., PAPA F.O., LOPES M.D. Effects of the cryopreservation process on dog sperm integrity. **Animal Reproduction**, v.17, n.1, 2020.

SIEME H, OLDENHOF H, WOLKERS WF. Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. **Reproduction Domestic Animals**, v.50, n.3, p.20–26 2015; doi: 10.1111/rda.12594.

SINGER SJ, NICOLSON GL. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. **Science**, Vol. 175, 1972.

STIEGER B, STEIGER J, LOCHER KP. Membrane lipids and transporter function. **BBA - Molecular Basis of Disease** 1867 (2021) 166079

STRIMBU K, TAVEL JÁ. What are Biomarkers?. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v.5, n.6, p.463-466, November 2010.

SUAREZ-TRUJILLO A, S.M. LUECKE A, L. LOGAN A, C. BRADSHAW B, K.R. STEWART A, R.C. MINOR B, C. RAMIRES FERREIRA C, T.M. CASEY. Changes in sow milk lipidome across lactation occur in fatty acyl residues of triacylglycerol and phosphatidylglycerol lipids, but not in plasma membrane phospholipids. **Animal** 15 (2021) 100280

SUHAIMAN L AND BELMONTE SA (2024) Lipid remodeling in acrosome exocytosis: unraveling key players in the human sperm. **Front. Cell Dev. Biol.** 12:1457638. doi: 10.3389/fcell.2024.1457638

TRAMESSAR CT, ANDERSON AL, BROMFIELD EG, TRIGG NA, PARAMESWARAN S, STANGER S, WEIDENHOFER J, ZHANG HM, ROBERTSON AS, SHARKEY DJ, NIXON B, SCHJEMKEN J. The efficacy and functional consequences of interactions between human spermatozoa and seminal fluid extracellular vesicles. **Reproduction and Fertility** (2024) 5 e230088 <https://doi.org/10.1530/RAF-23-0088>

TRAVIS AJ, KOPF GS. The role of cholesterol efflux in regulating the fertilization potential of mammalian spermatozoa. **J Clin Invest.** 2002;110(6):731-736. <https://doi.org/10.1172/JCI16392>

TSUI-PIERCHALA BA, ENCINAS M, MILBRANDT J, JOHNSON EM. Lipid rafts in neuronal signaling and function. **TRENDS in Neurosciences**, v.25, n.8, 2002

VILLA-DUQUE N, AGUDELO-FLÓREZ JJ, TERRAZA-MARTINEZ R, ROMERO-CÁRDENAS E, GÓMEZ G, VALENCIA J. NPC2, a seminal plasma protein with membrane cholesterol-binding ability, influences the cryotolerance and functionality of spermatozoa from Chino Santandereano bulls. **Animal Reproduction Science** 274 (2025) 107758

WANG D, TANG Y e WANG Z (2023) Role of sphingolipid metabolites in the homeostasis of steroid hormones and the maintenance of testicular functions. **Front. Endocrinol.** 14:1170023. doi: 10.3389/fendo.2023.1170023

WALTERS JLH, GADELLA BM, SUTHERLAND JM , NIXON B, BROMFIELD EG. Male Infertility: Shining a Light on Lipids and Lipid-Modulating Enzymes in the Male Germline. **J. Clin. Med.** 2020, 9, 327; doi:10.3390/jcm9020327

WOOD PL, SCOGGIN K, BALL BA, TROEDSSON MH, SQUIRES EL. Lipidomics of equine sperm and seminal plasma: Identification of amphiphilic (O-acyl)- ω -hydroxy-fatty acids. **Theriogenology**, v.86, p.1212–1221, 2016.

XUE, S.-H.; XU, B.-B.; YAN, X.-C.; ZHANG, J.-X.; SU, R. Sperm Membrane Stability: In-Depth Analysis from Structural Basis to Functional Regulation. **Vet. Sci.** 2025, 12, 658. <https://doi.org/10.3390/vetsci12070658>

ZAMORA-OBANDO H. R., GODOY A.T., AMARAL A.G., MESQUITA A.S., SIMÕES B.E.S, REIS H.O., ROCHA I., DALLAQUA M., BAPTISTÃO M., FERNANDES M.C.V., LIMA M.F., SIMIONATO A.V.C.. Biomarcadores Moleculares De Doenças Humanas: Conceitos Fundamentais, Modelos De Estudo E Aplicações Clínicas. **Química Nova**, v.15, n.9, p.10989-11113, 2022.

ZHANG J, ZHU Z, HUANG J, YANG H, WANG Q, ZHANG Y. Analyzing the impact and mechanism of bisphenol A on testicular lipid metabolism in *Gobiocypris rarus* through integrated lipidomics and transcriptomics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.265, 115498, 2023

ZHANG Y, DING N, CAO J, ZHANG J, LIU J, ZHANG C, JIANG L. Proteomics and Metabolic Characteristics of Boar Seminal Plasma Extracellular Vesicles Reveal Biomarker Candidates Related to Sperm Motility. **Proteome Res.** 2024, 23, 3764–3779

CAPÍTULO 2

ARTIGO**Análise lipídica de espermatozoides de garanhões resistentes e sensíveis
a criopreservação.**

Lipid analysis of spermatozoa from stallions resistant and sensitive to
cryopreservation

Dalmyr Roza Rodrigues^{*a}, Jose Antonio Dell'Aqua Jr^a

^aDepartament of Veterinary Surgery Animal Reproduction, São Paulo State
University (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science,
Botucatu, Brazil.

*Corresponding author. Tel.: +55 11 9 8669-4756

E-mail Address: dalmyr.rodriques@unesp.br

¹ Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X,

Ranqueada como A1 pelo QUALIS – CAPES de 2019

[Guide for authors - Theriogenology - ISSN 0093-691X \(elsevier.com\)](#)

Resumo

Entender a lipidômica dos espermatozoides é essencial para elucidar as alterações da permeabilidade da membrana induzidas pela criopreservação do sêmen de garanhões, visto que, a permeabilidade da membrana está ligada e influenciada por sua composição lipídica. Assim, a identificação dos lipídios presentes na membrana espermática pode fornecer informações cruciais para uma melhor qualidade espermática pós-descongelamento. O objetivo deste estudo é identificar e comparar o perfil lipídico da membrana plasmática de espermatozoides de garanhões criossensíveis (*BAD Freezers*) e criorresistentes (*GOOD Freezers*). O sêmen de 16 garanhões (n=16) foi avaliado e classificado em dois grupos: *GOOD* (n=8) e *BAD* (n=8). O perfil lipídico dos espermatozoides foi realizado com MALDI-MS sem adição de um extensor e com a remoção do plasma seminal. As análises foram realizadas com o MetaboAnalyst 6.0 e a análise discriminante do PLS-DA para demonstrar a variação entre *BAD* e *GOOD*. Os lipídios diferencialmente expressos no gráfico de Volcano seguiram os critérios: valores de $P < 0,05$ e fold change (FC) ≥ 2 . No gráfico de pontuação VIP, quantificamos a relevância de cada lipídio encontrado > 2 . Foram identificados 165 lipídios, 10 lipídios apresentaram diferenças entre os grupos, 4 apresentaram maior abundância no grupo *BAD* (960.5094 [IPC 38:0;O3, Inositolfosforilceramida], 517.2585 [ST 29:3;O, Lipídios de Esteróis], 924.4688 [PC 39:7, Glicerofosfocolina], 424.1616 [CAR 10:0, Acil carnitina]) e 6 no grupo *GOOD* (623.3115 [LPI 18:0, Lisofosfatidilinositol], 804.4195 [PS 35:6, Glicerofosfoserina], 873.4483 [PI 34:5, Glicerofosfoinositol], 510.255 [LPC 14:1, Lisofosfatidilcolina], 782.4298 [PC O-29:1, Glicerofosfocolina], 427.2135 [ST 23:4;O6, Lipídios de Esteróis]). Foi identificada uma diferença no perfil lipídico entre os grupos. O mapeamento do metabolismo lipídico possibilita a identificação dos pontos vulneráveis, com finalidade de melhorar a qualidade espermática de garanhões.

Palavra-chave: Criopreservação, Membrana Plasmática, Sêmen, Fosfolipídios, Mass Spectrometry

1 INTRODUÇÃO

A fertilidade reduzida do sêmen criopreservado deve-se em grande parte aos danos causados aos espermatozoides durante a criopreservação, que compromete a viabilidade celular e promovem perdas funcionais [1,2,3,4,5]. O principal alvo da crioinjúria é a membrana plasmática, que é exposta a estressores osmóticos e a temperaturas inferiores às fisiológicas, favorecendo o choque térmico e a transição lipídica do estado líquido cristalino para o estado de gel [3,6,7,8], levando a injúrias mitocondriais, desestabilização acrossomal e quebra da assimetria da bicamada lipídica, perdendo a homeostase e a capacidade de manutenção celular [1,2,9,10,11,12].

As interações lipídicas na membrana são moduladores essenciais da qualidade espermática e da criorresistência. Alterações na organização lipídica-proteica estão correlacionadas com a fluidez e a criorresistência do sêmen humano [13], e pode-se esperar um padrão similar em equinos dado o efeito da composição lipídica na fluidez da membrana [3]. Os glicerofosfolipídios (GP), como a fosfatidilcolina (PC), e os esfingolipídios (SM) são responsáveis pela integridade da membrana e pelo fornecimento de substrato energético [14,15,16].

A composição lipídica da membrana espermática exhibe uma marcante variabilidade individual entre os ganhões [17]. Essa variabilidade na proporção específica de classes de lipídios, influencia diretamente a fluidez e a resiliência estrutural da bicamada lipídica frente ao estresse térmico e osmótico da criopreservação, e a compreensão do perfil lipídico é crucial para entender a criotolerância [18, 19, 20]. Ganhões com boa qualidade espermática apresentam uma abundância superior de PC e de certos ácidos graxos como o láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e oleico (C18:1n9c), que se correlacionam positivamente com a motilidade e integridade funcional pós-descongelção [21].

A membrana espermática é rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), o que confere a fluidez essencial para a motilidade, mas aumenta drasticamente sua vulnerabilidade à peroxidação lipídica (LPO) induzida pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o congelamento [2,9,12,22]. O processo de criopreservação acarreta o desprendimento de constituintes

lipídicos específicos, como fosfolipídios e colesterol [23,24], e a perda do colesterol em particular desestabiliza a membrana, podendo desencadear a capacitação prematura ou "criocapacitação", o que reduz a longevidade da célula no trato reprodutivo feminino [25].

Durante o processo de criopreservação observa-se uma particularidade individual entre garanhões, permitindo que alguns animais apresentem maior resistência ao processo de criopreservação seminal, sendo classificados como criorresistentes (*GOOD Freezers*), e animais com baixa tolerância classificados como criossensíveis (*BAD Freezers*) [26].

Na busca para compreender a dinâmica lipídica da membrana espermática do garanhão, este trabalho visa analisar e identificar o perfil lipídico de espermatozoides e relacioná-los a criotolerância. Com isso busca-se otimizar, melhorar e aumentar a eficiência reprodutiva de garanhões criossensíveis.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais e design experimental

O estudo foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu (FMVZ-UNESP/Botucatu), localizada no estado de São Paulo, na latitude sul de 22°53'09" e longitude oeste de 48°26'42". Os animais ficaram alojados no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ-UNESP/Botucatu, e permaneceram estabulados, foram alimentados com feno e concentrado, e receberam água à vontade.

Os aspectos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Experimento Animal (CONCEA) foram considerados em cada etapa desse estudo. O estudo foi conduzido de acordo com protocolo aprovado pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, sob o protocolo #000.417/25.

Foram utilizados garanhões de diferentes raças, com idade entre 7 e 15 anos. Todos os garanhões apresentaram motilidade total > 60% e motilidade progressiva > 30% do sêmen fresco, 16 garanhões no total (n=16) e foram

divididos igualmente em dois grupos, 8 garanhões no grupo *BAD Freezer* n=8 (sensíveis à criopreservação), e 8 garanhões no grupo *GOOD Freezer* n=8 (resistentes à criopreservação). Os animais classificados como *GOOD* foram os animais que apresentaram motilidade total $\geq 35\%$ pós-descongelação, e como *BAD* os animais que apresentaram motilidade total inferior a esse limiar pós-descongelação de acordo com Aurich *et al.* [27].

2.2 Coleta e Preparo das Amostras

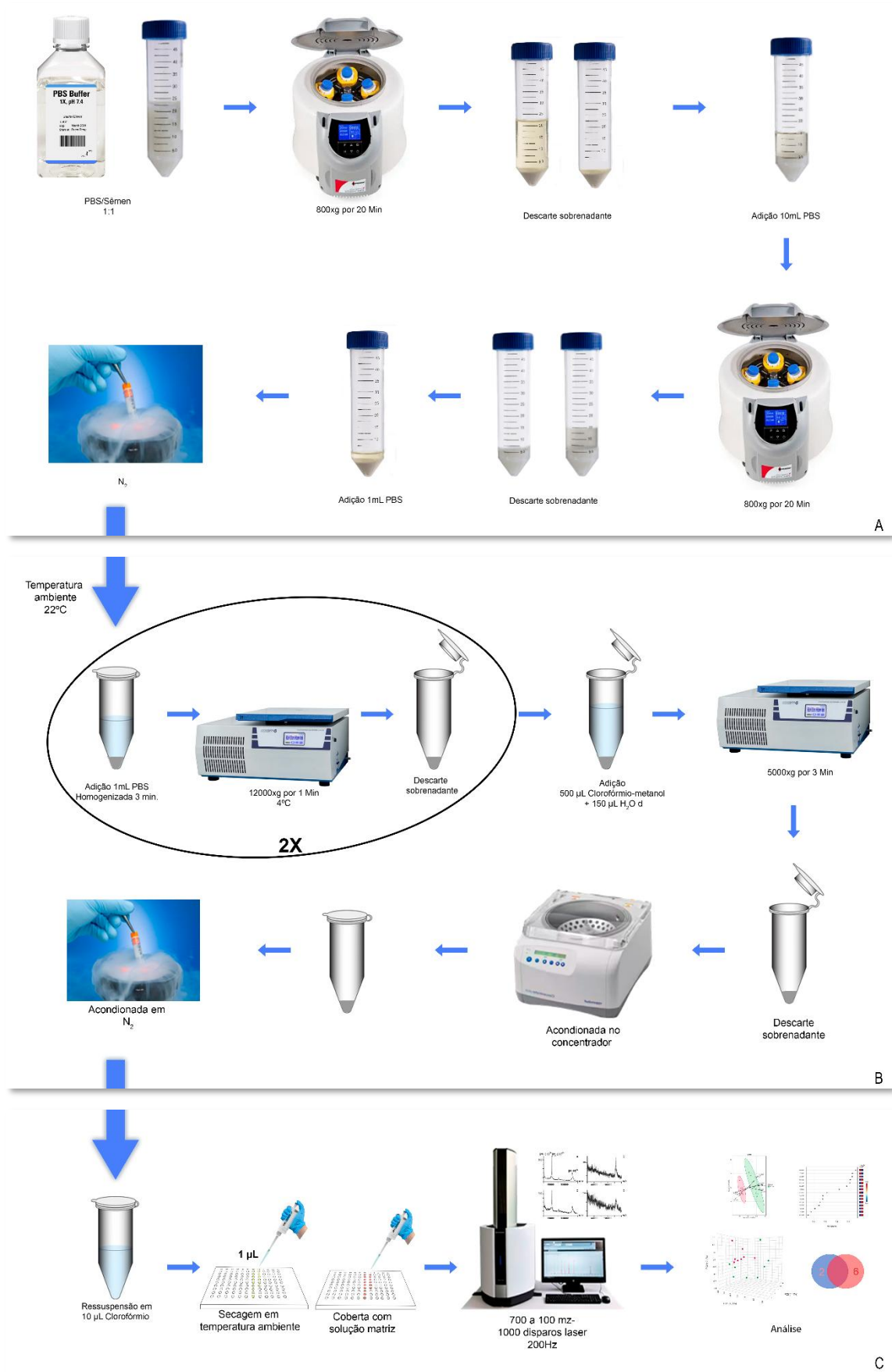
O sêmen foi coletado utilizando uma vagina artificial (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), e a fração de gel foi removida com um filtro de náilon.

Para a separação dos espermatozoides do plasma seminal, o sêmen foi diluído (1:1) com PBS e foi centrifugado a 800 x g por 20 minutos. O sobrenadante foi removido cuidadosamente, deixando apenas o pellet de esperma intacto. O pellet resultante foi ressuspensão em 10 mL de PBS e centrifugado uma segunda vez (800 x g / 20 minutos) antes da remoção do sobrenadante e da ressuspensão do pellet em 1,0 mL de PBS, que foi congelado rapidamente em nitrogênio líquido para armazenamento antes da análise (Figura 1a).

2.3 Lipidômica

As amostras foram submetidas à extração líquido-líquido dos lipídios totais seguindo o protocolo descrito por Bligh e Dyer [28] com modificações. Uma alíquota foi descongelada à temperatura ambiente, e ressuspensa em 1 mL de PBS e homogeneizada por 3 min. A amostra foi centrifugada a 12.000 x g por 1 min em centrífuga refrigerada a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido mais uma vez. Posteriormente, 500 µL de uma mistura de solventes clorofórmio-metanol (2:1 v/v) e 150 µL de água destilada foram adicionados ao sedimento, e os tubos agitados vigorosamente por 2 min. A amostra foi recentrifugada a 5.000 x g por 3 min à temperatura ambiente. O sobrenadante aquoso foi descartado e o pellet foi coletado, em seguida a amostra foi acondicionada no concentrador para secagem por 60 minutos e armazenada a -196°C (Figura 1b). As amostras foram ressuspensas em 10 µL

162 de clorofórmio para análise por MALDI-MS. Cada amostra de extrato (1 μ L) foi
163 depositada em um ponto na placa-alvo MALDI, e deixada para secar à
164 temperatura ambiente e coberta com a solução da matriz (1 μ L de ácido 2,5-di-
165 hidroxibenzoico, DHB, 30 mg/mL em metanol) (Figura 1c). Os dados de MALDI
166 foram adquiridos utilizando um espectrômetro de massas Autoflex III MALDI com
167 tempo de voo (TOF) operado no modo reflectron e equipado com tecnologia laser
168 smartbeam™. Os dados de MS foram adquiridos no modo íon positivo e na faixa
169 de m/z de 700 a 1000, com média de 1000 disparos consecutivos de laser e
170 frequência de 200 Hz. Os espectros de massa brutos foram processados usando
171 o *software* FlexAnalysis e submetidos à análise multivariada. No FlexAnalysis
172 cada amostra avaliada em MS, selecionou-se a razão m/z correspondente a
173 cada padrão molecular discriminativo, com a finalidade de construir arquivos com
174 a lista de picos de cada grupo.



2.4 Análise Estatística

Para a análise estatística de lipidômica, foram considerados os íons em cada grupo quando ele estava presente em pelo menos 50% + 1 das amostras, caso contrário as amostras foram zeradas. A normalização logarítmica foi realizada para ajustar as diferenças entre as amostras, assim, os dados se tornaram mais homogêneos e a análise mais precisa. A análise estatística multivariada dos dados MALDI-MS foi realizada no software MetaboAnalyst 6.0.

No metaboanalyst os grupos foram agrupados de forma não hierárquica, com as amostras divididas em um número predeterminado de grupos, foi realizada a transformação logarítmica Log10 e escala de dados "*Range scaling*".

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para descrever a variação da amostra, determinar a precisão da divisão do grupo e preservar as divisões mais relevantes.

A análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) foi utilizada para classificar a variável em ordem de importância, demonstrando a importância das variáveis na pontuação de projeção (pontuação VIP), na pontuação VIP foi considerada $\alpha > 2$. O gráfico vulcano foi utilizado para comparar os grupos utilizando os critérios de fold change ≥ 2 com o grupo GOOD sendo utilizado como base, e teste-*t* FDR $< 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.5 Análise Lipídica

Os lipídios que apresentaram importância estatística foram identificados e classificados pela "massa" e selecionados pelo menor "delta", de acordo com o banco de dados lipídico "*Lipid Metabolites and Pathways Strategy (LIPID MAPS®)*" [29], analisados quanto as suas funções lipídicas no aplicativo web LION/web (lipidontology.com) [30], foi analisado o metabolismo lipídico através da enciclopédia de genes e genomas de Kyoto - KEGG (kegg.jp) [31].

3 RESULTADOS

3.1 Lipidômica dos espermatozoides

Foram identificados 165 lipídios, desses, 10 se mostraram diferencialmente abundantes nos grupos, sendo 4 no grupo *BAD* e 6 no grupo *GOOD*, suas características estão dispostas na tabela 1 conforme classificação realizada na base de dados *LIPID MAPS*[®] (Tabela 1), e representados no gráfico vulcano (Figura 3). 146 lipídios se mostraram em comum entre os grupos, 7 apresentaram-se exclusivamente no grupo *BAD* e 12 exclusivamente no grupo *GOOD* (Figura 2).

Tabela 1: Lipídios identificados que apresentaram diferença entre os grupos

Massa	Nome	Classe principal	Subclasse	Volcano	VIP
960.5094	IPC 38:0;O3	Esfingolipídios	Inositolfosforilceramida	☑	☑
517.2585	ST 29:3;O	Lipídios de Esteróis	Lipídios de Esteróis	☑	☑
924.4688	PC 39:7	Glicerofosfolipídios	Glicerofosfocolina	☑	☑
424.1616	CAR 10:0	Ácidos Graxos	Acil carnitina	☑	☑
623.3115	LPI 18:0	Glicerofosfolipídios	Lisofosfatidilinositol	☑	☑
804.4195	PS 35:6	Glicerofosfolipídios	Glicerofosfoserina	☑	☑
873.4483	PI 34:5	Glicerofosfolipídios	Glicerofosfoinositol	☑	☑
510.255	LPC 14:1	Glicerofosfolipídios	Lisofosfatidilcolina	☑	☑
782.4298	PC O-29:1	Glicerofosfolipídios	Glicerofosfocolina	☑	☑
427.2135	ST 23:4;O6	Lipídios de Esteróis	Lipídios de Esteróis	☑	☑

Tabela 1: Características dos lipídios abundantes identificados no gráfico vulcano e no gráfico VIP. ■ *BAD* ■ *GOOD*

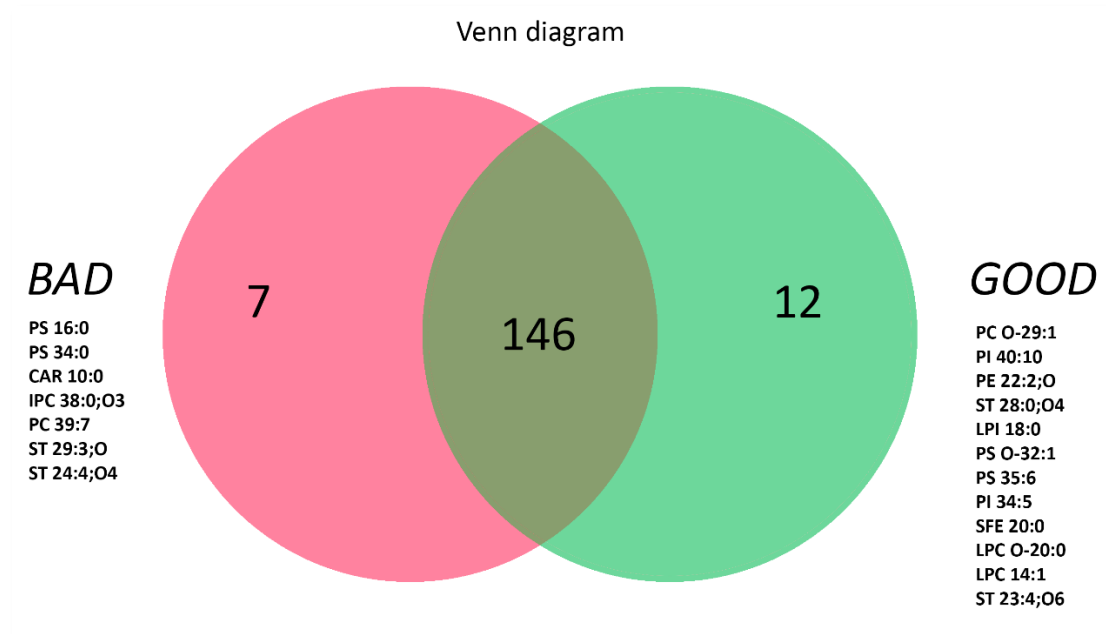


Figura 2: Diagrama de Venn, 146 lipídios se apresentam em comum entre os grupos, 7 com exclusividade no grupo BAD e 12 com exclusividade no grupo GOOD.

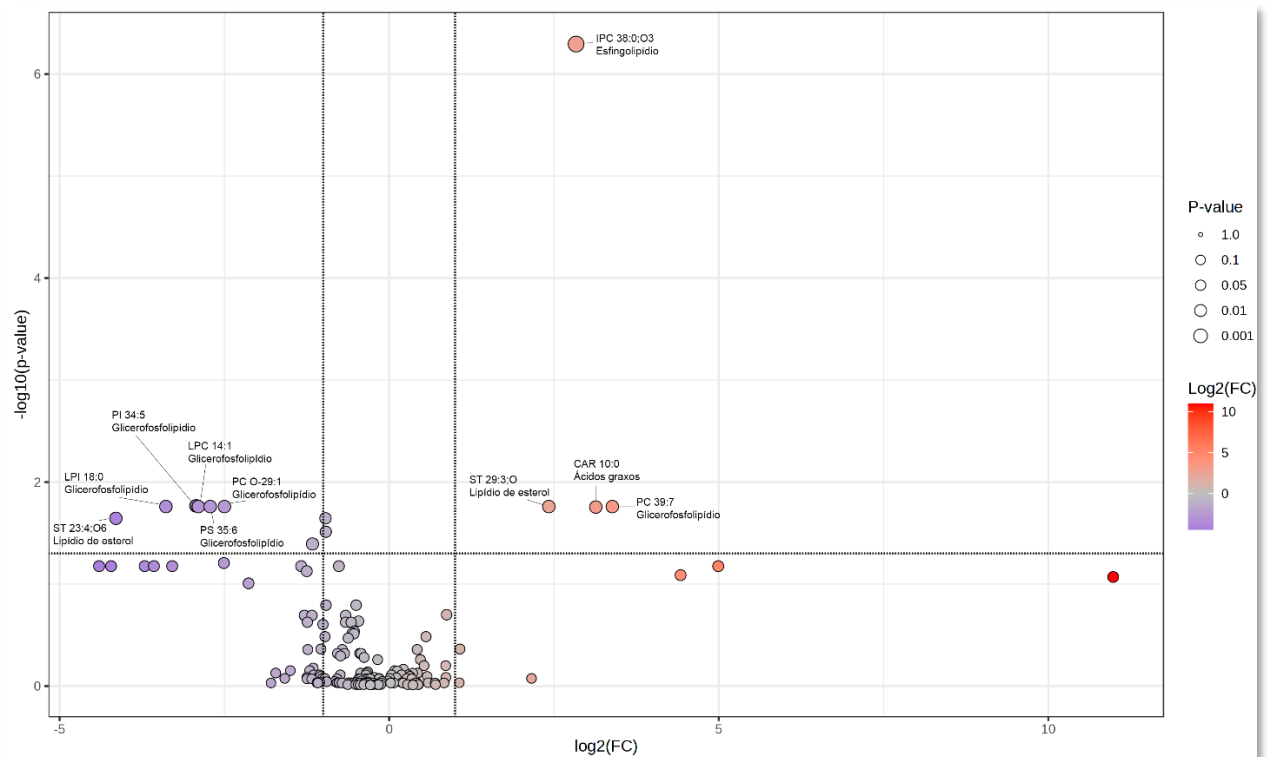


Figura 3: Gráfico de volcano dos lipídios diferencialmente abundantes em garanhões *BAD* e *GOOD Freezers*. Log2(FC) - ■ upregulation no grupo *BAD* e ■ downregulation no grupo *BAD*. Quanto mais distante sua posição de (0,0), mais significativa é a característica. Linhas tracejadas verticais indicam os limiares de $FC \geq 2$ e horizontal p-valor ajustado (FDR) $< 0,05$.

Pela análise dos principais componentes (PCA) não supervisionada, observa-se através do gráfico de pontuação (Figura 4a) uma dispersão entre os grupos com predisposição de separação dos grupos, mas com uma pequena sobreposição. Observamos no dendrograma de agrupamento hierárquico (Figura 4b) a formação de dois grandes agrupamentos principais. O agrupamento principal superior contém as amostras do grupo *GOOD*, e o agrupamento principal inferior as amostras do grupo *BAD*, porém o agrupamento superior (*GOOD*) conta com a presença da amostra *BAD2*. A amostra *BAD2* apresenta um perfil lipídico mais similar ao perfil metabólico das amostras *GOOD*. A visualização do perfil metabólico das amostras por grupo e por amostra está disponível no mapa de calor (Figura 5).

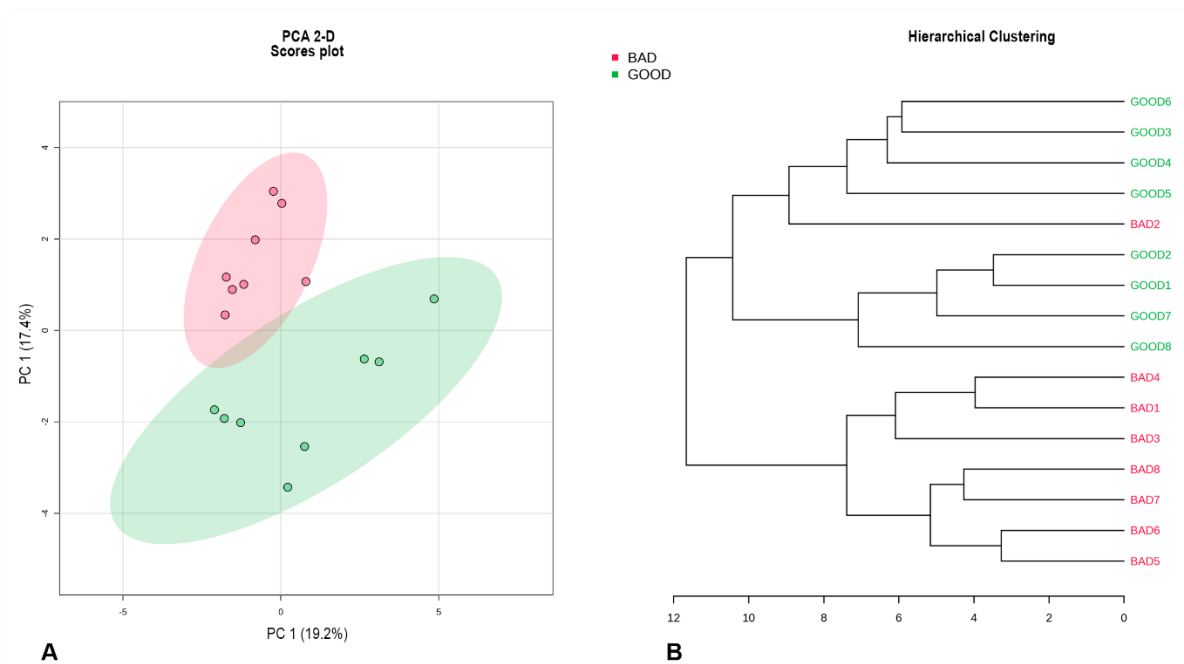


Figura 4: (A) Análise de componentes principais (PCA) do perfil lipídico espermático. Os grupos apresentem tendência a separação com pequena sobreposição. (B) No dendrograma hierárquico a amostra BAD 2 apresenta perfil lipídico semelhante ao grupo GOOD.

A análise PERMANOVA revelou uma diferença estatisticamente significativa nos perfis lipídicos entre os agrupamentos avaliados ($F=9,743$; $R^2 = 0,41$; $p = 0,001$). Notavelmente, o fator de agrupamento explicou aproximadamente 41% da variância total observada nos dados, confirmando uma distinção robusta na composição lipídica entre os grupos *BAD* e *GOOD*.

No mapa de calor observamos a intensidade dos metabólitos (picos mz/rt) em todas as amostras, visualizando os padrões de expressão metabólica do grupo *BAD* a esquerda, e do grupo *GOOD* a direita.

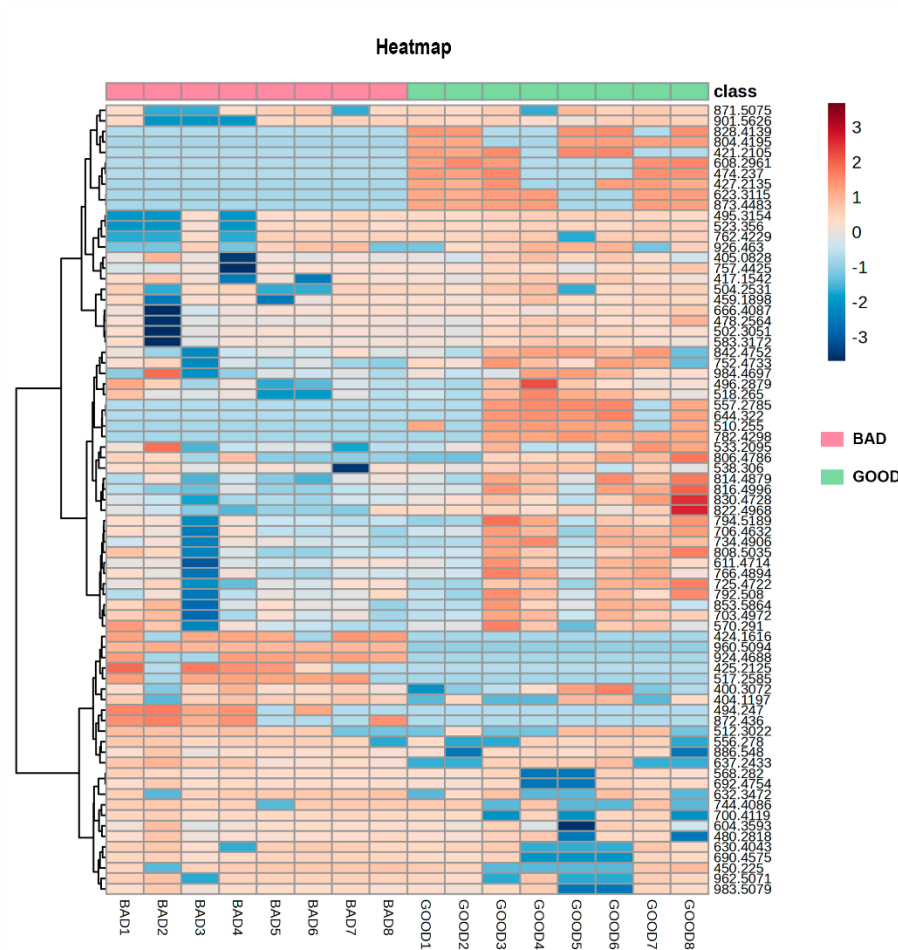


Figura 5: Mapa de calor da lipidômica espermática mostra a expressão dos lipídios nas amostras, em vermelho aumentas e em azul diminuídas.

O metabolismo lipídico está descrito no diagrama de cordas onde observamos a atuação dos lipídios nos diversos metabolismos (Figura 6) e na tabela 2.

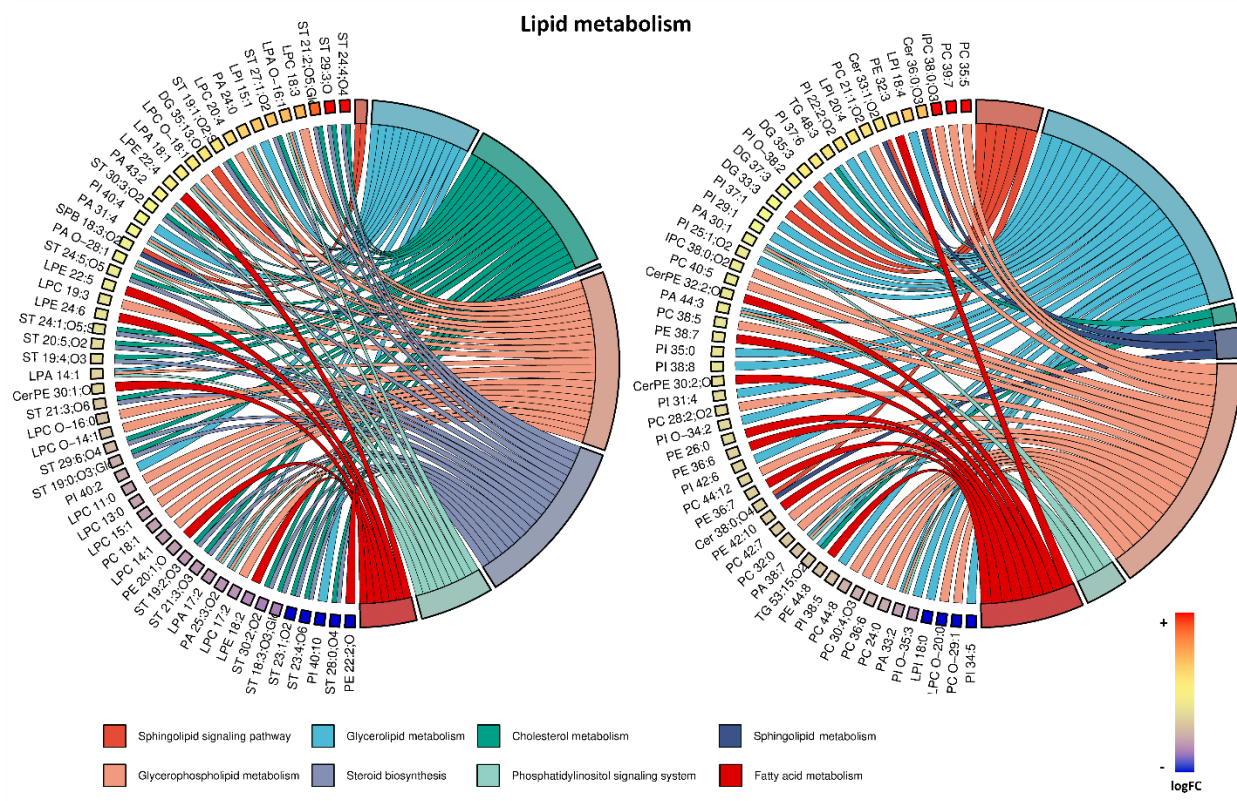


Figura 6: Diagrama de cordas. Identificação da atuação dos lipídios em diversos metabolismos.

Tabela 2: Identificação do metabolismo lipídico

Nome	Classe principal	Subclasse	Participa do metabolismo
IPC 38:0;O3	Esfingolipídios	Inositolfosforilceramida	Glicerofosfolipídio
ST 29:3;O	Lipídios de Esteróis	Lipídios de Esteróis	Colesterol / Biossíntese de Esteróides
PC 39:7	Glicerofosfolipídios	Glicerofosfocolina	Glicerofosfolipídio
CAR 10:0	Ácidos Graxos	Acil carnitina	N/I
LPI 18:0	Glicerofosfolipídios	Lisofosfatidilinositol	Glicerolipídio
PS 35:6	Glicerofosfolipídios	Glicerofosfoserina	N/I
PI 34:5	Glicerofosfolipídios	Glicerofosfoinositol	Glicerolipídio
LPC 14:1	Glicerofosfolipídios	Lisofosfatidilcolina	Glicerofosfolipídio
PC O-29:1	Glicerofosfolipídios	Glicerofosfocolina	Glicerofosfolipídio
ST 23:4;O6	Lipídios de Esteróis	Lipídios de Esteróis	Colesterol / Biossíntese de Esteróides

Tabela 2: Participação dos lipídios nos metabolismos. N/I – não identificado. ■ BAD ■ GOOD

4 DISCUSSÃO

Na busca para promover a melhor crioproteção ao espermatozoide, entender como cada indivíduo se comporta frente as mais intempéries sofridas durante a criopreservação se faz necessário. A análise lipidômica revelou diferenças substanciais na composição da membrana plasmática entre espermatozoides de garanhões classificados como *GOOD* e *BAD Freezers*. A criopreservação impõe estresses osmóticos e térmicos ao espermatozoide, e a sobrevivência da célula espermática é dependente da homeostase e da arquitetura lipídica da sua membrana [3]. A identificação de assinaturas lipídicas diferenciais não apenas confirma a membrana como o principal alvo da crioinjúria, mas também estabelece potenciais biomarcadores de fertilidade e tolerância ao congelamento.

No grupo *GOOD* observamos a abundância de 6 lipídios específicos que conferem proteção antioxidante, plasticidade estrutural e competência de sinalização, justificando a superior qualidade espermática pós-descongelação neste grupo.

A abundância e exclusividade do PC O-29:1 (Glicereofosfocolina) é um achado de extrema relevância fisiológica. Trata-se de um glicerofosfolipídio de éter, conhecido como plasmalogênio, caracterizado por uma ligação vinil-éter na posição *sn*-1. Esta ligação atua como um "antioxidante de sacrifício", ela é preferencialmente clivada por espécies reativas de oxigênio (ROS), neutralizando os radicais livres e protegendo os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) adjacentes contra a cascata letal de peroxidação lipídica (LPO) gerada durante o congelamento [20, 32]. A presença deste "escudo" antioxidante endógeno preserva a integridade da membrana e a motilidade celular pós-descongelação. Corroborando com Cabrera *et al.* (2018) [20], que identificaram que os plasmalogênios estão associados a melhor qualidade espermática pós-descongelação.

A presença dos fosfolipídios PS 35:6 (Glicerofosfoserina) e PI 34:5 (glicerofosfoinositol), reflete uma membrana metabolicamente apta para a fertilização. Reforçando estudos que identificaram e associaram níveis altos de

inositóis e serinas com a capacidade superior de criopreservação do sêmen equino, pois, o PI é vital para a manutenção da homeostase intracelular de cálcio e atua como precursor de mensageiros secundários críticos para a polimerização da actina e motilidade [33]. A fosfatidilserina, por sua vez, é essencial para manutenção da assimetria da bicamada lipídica. Espermatozoides de alta qualidade mantêm a PS no folheto interno, sua externalização regulada só deve ocorrer durante a capacitação fisiológica, garantindo que o espermatozoide responda adequadamente aos estímulos do trato reprodutivo feminino e consiga realizar a fusão da membrana acrossômica [34].

A abundância dos lipídios LPI 18:0 (Lisofosfatidilinositol) e LPC 14:1 (Lisofosfatidilcolina), produtos da ação da fosfolipase A2 (PLA2) [32], corrobora com Serafini & O'Flaherty (2025) [35], que descrevem os lisofosfolipídios como essenciais para modular a curvatura da bicamada e conferir a flexibilidade necessária para que o espermatozoide resista as variações volumétricas do choque osmótico e possa se expandir sem se romper, e posteriormente, realizar a reação acrossomal.

O lipídio de esterol ST 23:4;O6 (Colesterol) é crucial para promover uma boa regulação da temperatura de transição de fase. Estudos indicam que esteróis desempenham um papel fundamental na termodinâmica da membrana, intercalam-se entre os fosfolipídios da bicamada evitando a transição de fase abrupta do estado fluido para o estado de gel durante o resfriamento, prevenindo danos letais à membrana espermática [3, 7, 36].

No grupo BAD a abundância dos lipídios IPC 38:0;O3, ST 29:3;O, PC 39:7 e CAR 10:0, evidencia uma membrana estruturalmente rígida, com potencial de vulnerabilidade oxidativa, diminuindo a sobrevivência pós-descongelção.

A abundância marcante do esfingolipídio IPC 38:0;O3 (Inositol Fosforilceramida) é um dos achados mais críticos e reflete uma rigidez estrutural da membrana. Este esfingolipídio possui uma cadeia carbônica muito longa (C38) e totalmente saturada (0 ligações duplas) e elevada hidroxilação (O3), esta molécula forma interações de Van der Waals excessivamente fortes, resultando em um alto grau de empacotamento na bicamada [3, 8]. O resultado é a elevação drástica da temperatura de transição, fazendo com que a membrana passe

precocemente para o estado de "gel", perdendo a elasticidade e tornando-se suscetível à ruptura pela formação de cristais de gelo extracelular [8]. A modulação da temperatura de transição é uma alternativa para melhorar a qualidade espermática pós-descongelação, conforme Mocé e colaboradores (2010) [37] que, diminuindo a temperatura de transição melhoraram a qualidade do sêmen pós-descongelação.

A resistência ao choque térmico, um fator chave na criopreservação, está positivamente correlacionada com a relação colesterol/fosfolípido na membrana espermática, de modo que espécies com proporções mais elevadas, como coelhos e humanos, demonstram maior resistência a baixas temperaturas do que espécies sensíveis, como equinos [22, 38].

O papel fisiológico do colesterol na membrana é duplo: ele atua como um potente fator descapacitante no sêmen [39,40], e seu efluxo controlado é um pré-requisito obrigatório para que ocorra a capacitação espermática [2, 39, 40]. Durante o efluxo, mediado por ativadores como a albumina, a redução na concentração de colesterol diminui a microviscosidade da membrana, facilitando a redistribuição lipídica e o influxo de íons, o que culmina na hiperativação e na reação acrossomal [2, 41, 42, 43].

A disfunção espermática em pacientes inférteis, como nos casos de astenozoospermia, tem sido associada à manutenção de um padrão anormal de esteróis na membrana [44, 45], indicando que a homeostase do colesterol é um indicador sensível da fertilidade masculina, membranas com esteróis desregulados perdem a capacidade do efluxo correto do colesterol, resultando na falha de fertilização [46]. Tal fato corrobora com os resultados apresentados em outros estudos, onde a abundância do lipídio ST 29:3;O demonstra um desequilíbrio no metabolismo de esteróis, o que pode interferir na compactação das cadeias acila saturadas nas *lipid rafts*.

Esta interferência impede que a célula se adapte ao choque osmótico e as alterações volumétricas impostas pela formação de cristais de gelo e pela transição de fase de cristal líquido para gel durante o resfriamento [47, 48].

A presença de um esteroide de cadeia carbônica longa (C29) e alto grau de insaturação (3 ligações duplas) sugere uma desestabilização da bicamada lipídica, esteróis com múltiplas ligações duplas são alvos primários para a LPO [7, 49]. O ataque de ROS a essas duplas ligações gera subprodutos citotóxicos, como o 4-hidroxinonenal (4-HNE), que promovem a perda da seletividade da membrana e desencadeiam cascatas apoptóticas [21, 50].

Enquanto gametócitos com alta criotolerância apresentam membranas mais ricas em fosfatidilcolina e esteróis estabilizadores, o acúmulo de esteróis insaturados atípicos no grupo *BAD* atua como um biomarcador de fragilidade estrutural [51].

Do ponto de vista oxidativo e metabólico, o grupo *BAD* é altamente vulnerável. A alta concentração do glicerofosfolípido PC 39:7 (Glicerofosfocolina), que contém ácidos graxos de cadeia muito longa poli-insaturados (VLCPUFAs), representa o "calcanhar de Aquiles" dessas células. Embora insaturações promovam fluidez, necessária para flexibilidade da membrana, um excesso de duplas ligações separadas por pontes metilênicas atua como o alvo principal das ROS geradas no estresse térmico, deflagrando uma cascata severa de LPO que culmina na destruição da membrana, perda de motilidade e apoptose celular prematura [12, 52].

O lipídio CAR 10:0 (Decanoilcarnitina) elevado em gametócitos *BAD*, sugere um comprometimento na eficiência bioenergética mitocondrial, especificamente um bloqueio ou saturação na via da β -oxidação de ácidos graxos.

As acilcarnitinas desempenham um papel fundamental no metabolismo energético dos espermatozoides, atuando no transporte de ácidos graxos para a matriz mitocondrial, onde são oxidados para a produção de ATP, substrato essencial para a motilidade espermática [53, 54, 55]. No entanto, o acúmulo de intermediários de cadeia média, como a CAR 10:0 indica que, embora o transporte de lipídios possa estar ocorrendo para dentro da mitocôndria, a sua oxidação completa está ineficiente ou interrompida. Este fenômeno é característico de uma disfunção mitocondrial, onde as mitocôndrias danificadas pelo processo de criopreservação tornam-se incapazes de metabolizar

414 eficientemente os substratos lipídicos, levando ao acúmulo de acilcarnitinas de
415 cadeia média [56].

416 O acúmulo de CAR 10:0 reflete, uma incapacidade enzimática das
417 desidrogenases de acil-CoA de cadeia média, frequentemente inibidas ou
418 danificadas em condições de estresse celular [57]. O acúmulo de acilcarnitinas
419 de cadeia média no ambiente celular pode exercer efeitos deletérios diretos,
420 concentrações alteradas de CAR 10:0 foram relacionadas a diversas patologias
421 [58].

422 O perfil metabólico está intrinsecamente ligado ao estresse oxidativo. A
423 disfunção na cadeia de transporte de elétrons, comum em mitocôndrias de
424 espermatozoides de baixa qualidade, leva à produção excessiva de ROS. As
425 ROS, por sua vez, podem danificar as enzimas da β -oxidação, exacerbando o
426 acúmulo de metabólitos intermediários como a decanoilcarnitina [59].

427 A integração das vias metabólicas mapeadas reforça o conceito de que a
428 criorresistência depende de fluxos enzimáticos coordenados. As interações
429 ativas na biossíntese de esteroides e no metabolismo de glicerofosfolipídios /
430 glicerolipídios indicam que a viabilidade não depende de um único lipídio, mas
431 da capacidade do gameta em processar dinamicamente a remodelagem de suas
432 membranas [29].

433 A forte sinergia entre as rotas de metabolismo de glicerofosfolipídios e
434 glicerolipídios no grupo *GOOD* traduz o funcionamento contínuo do "Ciclo de
435 Lands". Neste ciclo, enzimas fosfolipases e aciltransferases atuam
436 sinergicamente, reciclando fosfolipídios oxidados (PC, PE) em lisofosfolipídios
437 (LPC, LPE) [60]. Enquanto os *GOOD freezers* possuem vias otimizadas que
438 permitem o *turnover* entre fosfatidilcolinas poli-insaturadas (PC) e seus análogos
439 de proteção (plasmalogênios e liso-espécies), os *BAD freezers* experimentam
440 um estancamento letal, onde vias incompletas da conversão mitocondrial e
441 acúmulo de ceramidas geram senescência precoce frente à criopreservação [29,
442 61].

443 Os dez lipídios identificados neste estudo — IPC 38:0;O3
444 (Inositolfosforilceramida), ST 29:3;O (Lipídios de Esteróis), PC 39:7

(Glicerofosfocolina) e CAR 10:0 (Acil carnitina) (abundantes no grupo *BAD*) e LPI 18:0 (Lisofosfatidilinositol), PS 35:6 (Glicerofosfoserina), PI 34:5 (Glicerofosfoinositol), LPC 14:1 (Lisofosfatidilcolina), PC O-29:1 (Glicerofosfocolina) e ST 23:4;O6 (Lipídios de Esteróis) (abundantes no grupo *GOOD*), são possíveis candidatos a biomarcadores lipídicos de criotolerância espermática em garanhões. Biomarcadores lipídicos têm sido propostos em diversas espécies como ferramentas de triagem e predição da qualidade seminal [21, 62, 63, 64], selecionando reprodutores, e otimizando protocolos de criopreservação.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo identificou que existe diferença no lipidoma espermático de garanhões *GOOD* e *BAD freezers*. Identificou lipídios exclusivos em cada grupo, sugerindo que o perfil lipídico tende a divergir os grupos, o que pode proporcionar maior criorresistência ou criossensibilidade. Possibilitou a identificação do metabolismo lipídico dos lipídios significativamente abundantes de ambos os grupos. Estas características se tornam muito relevantes, tendo em vista a possibilidade de correção através da adição de substâncias que corrijam este desequilíbrio, melhorando a qualidade do sêmen, porém mais pesquisas são necessárias para confirmação desta hipótese.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERÊNCIAS

- [1] Andrade a AFC, Pedrosa AC, Martins SMMK, Palchucan Nieto RS; Silva GF, Silva HZ. Criopreservação do sêmen suíno: desafios a serem superados que auxiliam a identificação de espermatozoides mais férteis. Anais do XXV Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.47, n.2, p.164-170, abr/jun. 2023
- [2] Borges J.C., Silva M.R., Guimarães J.D., Esper C.R., Franceschini P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.35, n.3, p.303-314, jul./set. 2011.
- [3] Castro, M.; Leal, K.; Pezo, F.; Contreras, M.J. Sperm Membrane: Molecular Implications and Strategies for Cryopreservation in Productive Species. Animals 2025, 15, 1808. <https://doi.org/10.3390/ani15121808>
- [4] Hezavehei M, Sharafi M, Fathi R, Shahverdi A, Gilani MAS. Membrane lipid replacement with nano-micelles in human sperm cryopreservation improves post-thaw function and acrosome protein integrity. Reproductive BioMedicine Online, v.43, n.2, p.257-268, 2021.
- [5] Sharafi, M.; Borghei-Rad, S.M.; Hezavehei, M.; Shahverdi, A.; Benson, J.D. Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. Animals 2022, 12, 3271. <https://doi.org/10.3390/ani12233271>
- [6] Coelho RWA, Dias JCO. Freezing equine semen after 24 hours of cooling. Research, Society and Development, v. 10, n. 1, e1831019939, 2021 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i1.9939>
- [7] Gautier C & Aurich C. “Fine feathers make fine birds” – The mammalian sperm plasma membrane lipid composition and effects on assisted reproduction. Animal Reproduction Science, n.246, 2022.

- 501 [8] Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Sperm Membrane Behaviour during
 502 Cooling and Cryopreservation. *Reproduction Domestic Animals*, v.50, n.3,
 503 p.20–26 2015; doi: 10.1111/rda.12594
- 504 [9] Alvarez JG, Storey BT. Evidence for Increased Lipid Peroxidative Damage
 505 and Loss of Superoxide Dismutase Activity as a Mode of Sublethal
 506 Cryodamage to Human Sperm During Cryopreservation. *Journal of Andrology*,
 507 v.13, n.3, p.232-241. 1992
- 508 [10] C. Ortega-Ferrusola, Y. Sotillo-Gala´ N, E. Varela-Ferna´ Ndez, J. M.
 509 Gallardo-Bolaños, A. Muriel, L. Gonza´ Lez-Ferna´ Ndez, J. A. Tapia, F. J.
 510 Peña. Detection of “Apoptosis-Like” Changes During the Cryopreservation
 511 Process in Equine Sperm. *Journal of Andrology*, v.29, n.2, March/April 2008
- 512 [11] Osman, R.; Lee, S.; Almubarak, A.; Han, J.-I.; Yu, I.-J.; Jeon, Y. Antioxidant
 513 Effects of Myo-Inositol Improve the Function and Fertility of Cryopreserved Boar
 514 Semen. *Antioxidants* 2023, 12, 1673. <https://doi.org/10.3390/antiox12091673>
- 515 [12] Hui Shi, Qian-Ying Li, Hui Li, Hai-Yan Wang, Chuan-Xi Fan, Qiao-Yan
 516 Dong, Bo-Chen Pan, Zhi-Liang Ji, Jian-Yuan Li, ROS-induced oxidative stress
 517 is a major contributor to sperm cryoinjury, *Human Reproduction*, Volume 39,
 518 Issue 2, February 2024, Pages 310-
 519 325, <https://doi.org/10.1093/humrep/dead250>
- 520 [13] Giraud MN, Motta C, Boucher D, Grizard G. Membrane fluidity predicts the
 521 outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reproduction*, v.
 522 15, n. 10, p. 2160–2164, 2000. doi: [10.1093/humrep/15.10.2160](https://doi.org/10.1093/humrep/15.10.2160)
- 523 [14] T. W. Scott & R. M. C. Dawson. Metabolism of Phospholipids by
 524 Spermatozoa and Seminal Plasma. *Biochemical Journal*, v.108, n.3, p.457-463,
 525 1968
- 526 [15] Scott TW. Lipid metabolism of spermatozoa. *J Reprod Fertil Suppl.* 1973
 527 Jul;18:65-76. PMID: 4580256.
- 528 [16] Alessandra A. Vireque, Alessandra Tata, Oswaldo F.L.L.O. Silva, Edson G.
 529 LoTurco, Augusto Azzolini, Christina R. Ferreira, Marilda H.Y. Dantas, Rui A.
 530 Ferriani, Rosana M. Reis. Effects of n-6 and n-3 polyunsaturated acid-rich

- 531 soybean phosphatidylcholine on membrane lipid profile and cryotolerance of
532 human sperm. *Fertility and Sterility*, v.106, n.2, p.273-283, 2016.
- 533 [17] Al-Kass, Z.; Morrell, J.M. Freezing Stallion Semen—What Do We Need to
534 Focus on for the Future? *Vet. Sci.* 2024, 11, 65.
535 <https://doi.org/10.3390/vetsci11020065>
- 536 [18] Aurich C*, Ferrusola CO, Vega FJP, Schrammel N, Morcuende D, Aurich J.
537 Seasonal changes in the sperm fatty acid composition of Shetland pony
538 stallions. *Theriogenology*, 107 (2018) 146-153.
- 539 [19] T. Cabrera T, Ramires-Neto C, Belaz KRA, Freitas-Dell'aqua CP, Zampieri
540 D, Tata A, Eberlin MN, Alvarenga MA, Souza FF. Influence of spermatozoal
541 lipidomic profile on the cryoresistance of frozen spermatozoa from stallions.
542 *Theriogenology*, 108 (2018) 161-166
- 543 [20] Evans HC, Dinh TTN, Hardcastle ML, Gilmore AA, Ugur MR, Hitit M,
544 Jousan FD, Nicodemus MC and Memili E (2021) Advancing Semen Evaluation
545 Using Lipidomics. *Frontiers in Veterinary Science*. 8:601794. doi:
546 10.3389/fvets.2021.601794
- 547 [21] Oddi S, Carluccio A, Ciaramellano F, Mascini M, Bucci R, Maccarrone M,
548 Robbe D, Dainese E. Cryotolerance of equine spermatozoa correlates with
549 specific fatty acid pattern: A pilot study. *Theriogenology*, 172, (2021) 88-94.
- 550 [22] Lone AS. Possible mechanisms of cholesterol-loaded cyclodextrin action
551 on sperm during cryopreservation. Possible mechanisms of cholesterol-loaded
552 cyclodextrin action on sperm during cryopreservation. *Animal Reproduction*
553 *Science* 192 (2018) 1–5
- 554 [23] Chakrabarty J, Banerjee D, Pal D, De J, Ghosh A, Majumder GC. Shedding
555 off specific lipid constituents from sperm cell membrane during
556 cryopreservation. *Cryobiology*, v.54, p.27-35, 2007
- 557 [24] A. Maldjiana,b, F. Pizzic, T. Gliozzic, S. Cerolinib, P. Pennya, R. Noble.
558 Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar
559 semen. *Theriogenology*, v.53, p.411-421, 2005

- 560 [25] Carro M, Ramírez-Vasquez RRA, Peñalva DA, Buschiazzi J, Hozbor FA
 561 Desmosterol Incorporation Into Ram Sperm Membrane Before
 562 Cryopreservation Improves in vitro and in vivo Fertility. *Frontiers Cell and*
 563 *Developmental Biology* v.9:660165. 2021 doi: 10.3389/fcell.2021.660165
- 564 [26] Bubeníčková F., Šichtař J., Novačková L., Sirohi J., Šimonik O. (2020): The
 565 structure of subpopulations of stallion spermatozoa after thawing differs
 566 between good and poor freezers. *Czech J. Anim. Sci.*, 65: 403–410.
- 567 [27] Aurich J, Kuhl J, Tichy A, Aurich C. Efficiency of Semen Cryopreservation in
 568 Stallions. *Animals*, 10, 1033, 2020; doi:10.3390/ani10061033
- 569 [28] Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification.
 570 *Can J Biochem Physiol.* 1959 Aug;37(8):911-7. doi: 10.1139/o59-099. PMID:
 571 13671378.
- 572 [29] Lipid Maps®, <https://www.lipidmaps.org/>
- 573 [30] LION/web, <http://lipidontology.com>
- 574 [31] KEGG, <http://kegg.jp>
- 575 [32] García BM, Fernández LG, Ferrusola CO, Salazar-Sandoval C, Rodríguez
 576 AM, Martínez HR, Tapia JA, Morcuende D, Peñ FJ. Membrane Lipids of the
 577 Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid
 578 Peroxidation. *Reprod Dom Anim* 46, 141–148 (2011); doi: 10.1111/j.1439-
 579 0531.2010.01609.x
- 580 [33] Ramires Neto C, Dell'Aqua CPF, Souza FF, Belaz KB, Eberlin MN, Y da
 581 Silva YFRS, Dell'Aqua Jr JA, Canisso IF, Alvarenga MA. Identification of
 582 phospholipids associated with semen cooling ability of Mangalarga Marchador
 583 stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 125 (2023) 104613
- 584 [34] Garcia-Oliveros Ln, Bozzi Ar, Silva Toc, Nascimento Fb, De Oliveira Tr,
 585 Miguel El, Alves Mbr, Rangel Rb, De Andrade Afc, De Arruda Rp, Kerns K,
 586 Celeghini Ecc. Phosphatidylserine translocation, cholesterol spatial distribution,
 587 and acrosome reaction reliably distinguish sperm capacitation from cryoinjury in
 588 bovine sperm. *Cryobiology*, v.121, 105302, 2025

- 589 [35] Serafini S, O’Flaherty C. Novel insights into the lipid signalling in human
590 spermatozoa. *Human Reproduction - Developments in reproductive biology and*
591 *medicine*, v.40, n.8, p.1440–1451, 2025
- 592 [36] Cheng X, Xie H, Xiong Y, Sun P, Xue Y and Li K (2023) Lipidomics profiles
593 of human spermatozoa: insights into capacitation and acrosome reaction using
594 UPLC-MS-based approach. *Front. Endocrinol.* 14:1273878.
595 doi:10.3389/fendo.2023.1273878
- 596 [37] Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham JK. Use of Cholesterol in Sperm
597 Cryopreservation: Present Moment and Perspectives to Future. *Reproduction in*
598 *Domestic Animals*, v.45, n.2, p.57-66, 2010.
- 599 [38] Mariana Lucía Bertuzzi, Jessica Mariela Luquez, Andrea Romina di Fonzo,
600 Gerardo Martín Oresti, María Ignacia Carretero, Lipid and fatty acid profile in
601 neat and collagenase-treated llama sperm. *Theriogenology*, v.241, 2025
- 602 [39] Suhaiman L and Belmonte SA (2024) Lipid remodeling in acrosome
603 exocytosis: unraveling key players in the human sperm. *Frontiers Cell*
604 *Developmental Biology* v.12:1457638. doi: 10.3389/fcell.2024.1457638
- 605 [40] Cross NL. Role of Cholesterol in Sperm Capacitation. *Biology Of*
606 *Reproduction* v.59, p.7–11, 1998
- 607 [41] Xue, S.-H.; Xu, B.-B.; Yan, X.-C.; Zhang, J.-X.; Su, R. Sperm Membrane
608 Stability: In-Depth Analysis from Structural Basis to Functional Regulation. *Vet.*
609 *Sci.* 2025, 12, 658. <https://doi.org/10.3390/vetsci12070658>
- 610 [42] Frits M. Flesch, Jos F. H. M. Brouwers, Patricia F. E. M. Nievelstein, Arie J.
611 Verkleij, Lambert M. G. van Golde, Ben Colenbrander, Barend M. Gadella;
612 Bicarbonate stimulated phospholipid scrambling induces cholesterol
613 redistribution and enables cholesterol depletion in the sperm plasma
614 membrane. *J Cell Sci* 1 October 2001; 114 (19): 3543–3555.
615 doi: <https://doi.org/10.1242/jcs.114.19.3543>
- 616 [43] Paula Maitan, Elizabeth G. Bromfield, Tom A.E. Stout, Bart M. Gadella,
617 Bart Leemans. A stallion spermatozoon’s journey through the mare’s genital

- 618 tract: In vivo and in vitro aspects of sperm capacitation. *Animal Reproduction*
619 *Science*, v.246, 2022
- 620 [44] A. Garolla, I. Sabovic, S. Tescari, L. De Toni, M. Menegazzo, I. Cosci, V.
621 De Filippis, M. Giarola, C. Foresta. Impaired sperm function in infertile men
622 relies on the membrane sterol pattern. *Andrology*, v.6, p.325–334, 2018
- 623 [45] Jiwei Li, Lijuan Yang, Juan Zhang, Yadong Tian, Donghua Li, Yaling Gu,
624 Guirong Sun, Xiangtao Kang. Effects of seminal plasma cholesterol and
625 androgen levels on breeding rooster sperm motility in vitro. *Animal*
626 *Reproduction Science*, v.282, 2025, 108023
- 627 [46] Di Nisio A, De Toni L, Sabovic I, Vignoli A, Tenori L, Dall'Acqua S, Sut S,
628 La Vignera S, Condorelli RA, Giaccone F, Ferlin A, Foresta C, Garolla A.
629 Lipidomic Profile of Human Sperm Membrane Identifies a Clustering of Lipids
630 Associated with Semen Quality and Function. *International Journal of Molecular*
631 *Sciences*, 2024, 25, 297. <https://doi.org/10.3390/ijms25010297>
- 632 [47] Parks JE e Lynch DV. Lipid Composition and Thermotropic Phase Behavior
633 of Boar, Bull, Stallion, and Rooster Sperm Membranes. *Cryobiology*, v.29,
634 p.255-266, 1992.
- 635 [48] Prochowska S, Bonarska-Kujawa D, Bobak L, Eberhardt M, Niżański W.
636 Fatty acid composition and biophysical characteristics of the cell Membrane of
637 feline spermatozoa. *Scientific Reports*, 14:10214, 2024.
- 638 [49] Palacios P, Peláez G, Soria M, Méndez S, Galarza-Álvarez L, Dorado J,
639 Santiago-Moreno J, Galarza DA. *L-carnitine* enhances the kinematics and
640 protects the sperm membranes of chilled and frozen-thawed Peruvian Paso
641 horse spermatozoa. *Cryobiology*, v.115, 2024, 104884
- 642 [50] Soria-Meneses PJ, Jurado-Campos A, Juan AR, Ângulo VM, Soler AJ,
643 Garde JJ, Fernández MR, Fernández-Santos MR. Effects of long-term
644 cryopreservation on sperm quality and oxidative stress in Manchega rams (*Ovis*
645 *aries*). *Reproduction* (2025) 170 e240402
- 646 [51] Suo J, Wang J, Zheng Y, Xiao F, Li R, Huang F, *et al.* (2024) Recent
647 advances in cryotolerance biomarkers for semen preservation in frozen form—A

- 648 systematic review. PLoS ONE 19(5): e0303567.
 649 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0303567>
- 650 [52] Oresti, G.M.; Luquez, J.M.; Belmonte, S.A. Lipid Signature of Motile Human
 651 Sperm: Characterization of Sphingomyelin, Ceramide, and Phospholipids with a
 652 Focus on Very Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids. *Int. J. Mol. Sci.* 2025,
 653 26, 9301. <https://doi.org/10.3390/ijms26199301>
- 654 [53] Nery IHAV,1 Robespierre A.J., Silva A, Souza HM, Arruda LCP, Monteiro
 655 MM, Seal DCM, Silva GR, Silva TMS, Carneiro GF, Batista AM, Câmara DR,
 656 Guerra MMP. Effects of L-Carnitine on Equine Semen Quality During Liquid
 657 Storage. *Biopreservation and biobanking*, v.18, n.5, 2020.
- 658 [54] Bazzano M, Laus F, Spaterna A, Marchegiani A. Use of nutraceuticals in
 659 the stallion: Effects on semen quality and preservation. *Reprod Dom Anim.*
 660 2021; 56:951–957. <https://doi.org/10.1111/rda.13934>
- 661 [55] Solanki O, Talluri TR, Jhamb D, Kumar S, Pargi KK, Paul N, Kutty M,
 662 Dedar RK, Meena M, Gaur M, Bhattacharya TK. L-Carnitine supplementation to
 663 the stallion extender attenuates the cryopreservation induced oxidative stress
 664 and ameliorates sperm functional attributes. *Journal of Equine Veterinary*
 665 *Science*, v.155, December 2025, 105731
- 666 [56] Strassner, F.M.; Demattio, L.; Siuda, M.; Malama, E.; Muffels, G.; Bollwein,
 667 H. Relationships Between Metabolism of Cryopreserved Equine Sperm
 668 Determined by the Seahorse Analyzer and Sperm Characteristics Measured by
 669 Flow Cytometry and Computer-Assisted Analysis of Motility. *Vet. Sci.* 2025, 12,
 670 1109. <https://doi.org/10.3390/vetsci12121109>
- 671 [57] Deda, O.; Panteris, E.; Meikopoulos, T.; Begou, O.; Mouskeftara, T.;
 672 Karagiannidis, E.; Papazoglou, A.S.; Sianos, G.; Theodoridis, G.; Gika, H.
 673 Correlation of Serum Acylcarnitines with Clinical Presentation and Severity of
 674 Coronary Artery Disease. *Biomolecules* 2022, 12, 354.
 675 <https://doi.org/10.3390/biom12030354>
- 676 [58] Dambrova M, Makrecka-Kuka M, Kuka J, Vilskersts R, Nordberg D,
 677 Attwood MM, Smesny S, Sen ZD, Guo AC, Oler E, Tian S, Zheng J, Wishart

- 678 DS, Liepinsh E, Schioth HB. Acylcarnitines: Nomenclature, Biomarkers,
679 Therapeutic Potential, Drug Targets, and Clinical Trials. *Pharmacol Rev*
680 74:506–551, July 2022
- 681 [59] Catalán, J.; Yáñez-Ortiz, I.; Torres-Garrido, M.; Ribas-Maynou, J.;
682 Lllavanera, M.; Barranco, I.; Yeste, M.; Miró, J. Impact of Seminal Plasma
683 Antioxidants on DNA Fragmentation and Lipid Peroxidation of Frozen–Thawed
684 Horse Sperm. *Antioxidants* 2024, 13, 322.
685 <https://doi.org/10.3390/antiox13030322>
- 686 [60] Law SH, Chan ML, Marathe GK, Parveen F, Chen CH, Ke LY. An Updated
687 Review of Lysophosphatidylcholine Metabolism in Human Diseases.
688 *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, p.1149, 2019.
689 doi:10.3390/ijms20051149
- 690 [61] Leite RF, Losano JDA, Nichi M. Fertility and susceptibility to sperm
691 cryopreservation: advances and challenges. *Anais da VII Reunião Anual da*
692 *Associação Brasileira de Andrologia Animal* Salvador, BA, 15 a 17 de junho de
693 2023. *Rev Bras Reprod Anim*, v.47, n.3, p.607-615, jul./set. 2023
- 694 [62] Cabrera, T. Correlação Entre O Perfil Lipídico Do Sêmen De Garanhões E
695 A Qualidade Espermática Pós- Descongelção. 2017. 64f. Tese (Doutorado em
696 Biotecnologia Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP
697 Botucatu, 2017
- 698 [63] Shan, S., Xu, F., Hirschfeld, M., Brenig, B. Sperm Lipid Markers of Male
699 Fertility in Mammals. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 8767.
700 <https://doi.org/10.3390/ijms22168767>
- 701 [64] Ramires Neto C, Freitas-Dell'aqua C.P., Sancler-Silva Y.F.R., K.R. Belaz,
702 D. Zampieri, A. Tata, M. Eberlin, F.O. Papa, J.A. Dell'aqua, M.A. Alvarenga.
703 Lipid profile differences in semen from “BAD” and “GOOD” freezer stallions.
704 *Journal of Equine Veterinary Science*, v.145, 105315, 2025.